

**In Vitro-Untersuchungen über den Abbau
von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten
in der Leber des Menschen**

Konrad Hahn

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553812_0044

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr.med. H. SCHWIEGK

IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN ABBAU VON TESTOSTERON
ZU GLUCURONIERTEN METABOLITEN IN DER LEBER DES MENSCHEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Konrad H A H N

München

1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Privatdozent Dr.D. ENGELHARDT

Mitberichtserstatter: Professor Dr.H. SCHWIEGK

Dekan: Professor Dr.W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 6.8.1976



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einführung	1
II. Fragestellung	4
III. Versuchsteil	6
1. Prinzip des methodischen Vorgehens	6
2. Steroid-Reinsubstanzen	7
a) Radioaktiv markierte Steroide	7
b) Nicht radioaktiv markierte Steroide	7
3. Reagenzien	9
4. Puffer-, Inkubations- und Reaktions- lösungen	10
5. Apparate und Hilfsgeräte	13
6. Arbeitsvorschrift	14
a) Gewinnung des Lebergewebes	14
b) Zellfraktionierung	15
c) Inkubationsbedingungen	15
d) Aufarbeitung der Inkubationsansätze	16
e) Gaschromatographie	18
f) Radioaktivitätsmessung	21
g) Berechnung	25
7. Beurteilung der Methoden	25
a) Gewebegewinnung	25
b) Zellfraktionierung	26
c) Inkubationsbedingungen	26
d) Adsorptionsextraktion von Testosteron, Testosteronglucuronid und deren Metaboliten	27
e) β -Glucuronidase-Hydrolyse	35
f) Gaschromatographische Trennung der Steroide	37
g) Beständigkeit der Steroidätherderivate	38
h) Bestimmung der Verluste bei der Auf- arbeitung der Lebergewebsextrakte	41

	Seite
IV. Ergebnisse	43
1. Inkubation von (4- ¹⁴ C)-Testosteron und (1,2- ³ H)-Testosteron mit Leberschnitten des Menschen	43
a) Versuche ohne Zusatz von Cofermenten	43
b) Versuche mit Zusatz von glucuronierenden Cofermenten	46
c) Versuche mit Zusatz von glucuronierenden und wasserstoffübertragenden Cofermenten	48
2. Inkubation von (4- ¹⁴ C)-Testosteron und (1,2- ³ H)-Testosteron mit subzellulären Fraktionen menschlicher Leber	53
a) Inkubation mit Zytosolfractionen	53
b) Inkubation mit Mikrosomenfraktionen	57
3. Inkubation von (1,2- ³ H)-Testosteron mit perkutan gewonnenen Leberstanzzyclindern des Menschen	63
a) Inkubationsversuche mit Zusatz von glucuronsäureübertragenden Cofermenten	63
b) Inkubation von histologisch normalen Leberstanzzyclindern mit Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten	65
c) Inkubation von pathologisch veränderten Leberstanzzyclindern mit Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten	67
V. Besprechung der Ergebnisse	80
VI. Zusammenfassung	90
VII. Anhang	93
VIII. Literaturverzeichnis	121

I. Einführung

Zahlreiche Untersuchungen bei verschiedenen Tierarten und auch beim Menschen haben ergeben, daß die Leber eine zentrale Stellung im Stoffwechsel von Testosteron einnimmt. Der hepatische Abbau von Testosteron zu freien Metaboliten wurde bei der Ratte unter anderem von SCHRIEFERS et al. (1967; 1969) sowie von LISBOA et al. (1968) und von DEMISCH et al. (1969) untersucht. Über den in vitro Stoffwechsel von Testosteron zu freien Metaboliten in der Leber des Menschen berichteten SAMUELS et al. (1950), STYLIANOU et al. (1961), LISBOA et al. (1965), BREUER et al. (1968), GUSTAFSSON und LISBOA (1968), LISBOA und GUSTAFSSON (1970), WORTMANN et al. (1970) und ENGELHARDT et al. (1971; 1972; 1973).

Nur wenige Untersuchungen liegen bisher jedoch über den Stoffwechsel von Testosteron zu konjugierten Metaboliten vor. ISSELBACHER konnte erstmals 1956 in vitro die Bildung von Testosteronglucuronid in der Mikrosomenfraktion der Meer-schweinchenleber nachweisen.

SCHRIEFERS und Mitarbeiter (1965) fanden nach Inkubation von Rattenleberschnitten, daß die Glucuronierung von Testosteron offenbar von einem normal funktionierenden Kohlenhydratstoffwechsel abzuhängen scheint. Weiterhin konnte diese Arbeitsgruppe in Inkubationsversuchen von Rattenleberschnitten (1965) und Mikrosomenfraktionen (1968) mit Testosteron eine bevorzugte Glucuronierung von 17β -hydroxylierten Metaboliten finden. Bei Inkubationsversuchen von Testosteron mit Rattenleberschnitten stellten SCHRIEFERS et al. (1972) Geschlechtsunterschiede fest. Männliche Tiere glucuronierten 5α - und 5β -Metaboliten von Testosteron, während die Leber weiblicher Tiere nur 5α -konfigurierte Metaboliten glucuronierte.

Später untersuchten STAIB et al. (1974) an männlichen Ratten die Ausscheidung von oral verabreichtem ($4\text{-}^{14}\text{C}$)-Testosteron in der Galle. Dabei fanden sie in der Glucuronidfraktion über-

wiegend 3 α ,5 β -konfigurierte Metaboliten von ^{14}C -Testosteron. Weitere in vitro-Untersuchungen über die hepatische Glucuronierung von Testosteron wurden mit Gewebeschnitten, Homogenaten und subzellulären Fraktionen aus tierischer Leber sowie mit der isolierten Leberperfusion von FISHMAN et al. (1956), SCHRIEFERS et al. (1966; 1968; 1970) und STAIB et al. (1971) durchgeführt.

Neben diesen in vitro-Untersuchungen an tierischem Lebergewebe stützten sich unsere Kenntnisse über die Glucuronierung von Testosteron in der Leber im wesentlichen auf in vivo - Untersuchungen beim Menschen.

Eingehende Untersuchungen am Menschen wurden von BAULIEU und Mitarbeitern (1965; 1966; 1967; 1968; 1970) durchgeführt. BAULIEU et al. (1965; 1968) injizierten 5 Patienten radioaktiv markiertes Testosteron und Testosteronglucuronid. Im Urin dieser Patienten fanden sie neben Testosteronglucuronid 5 α - und 5 β -hydrierte Glucuronsäuremetaboliten von Testosteron. Während injiziertes freies Testosteron zu 5 α - und 5 β -hydrierten Metaboliten umgesetzt wurde, wurde Testosteronglucuronid nur zu 5 β -hydrierten Verbindungen abgebaut. Beim Stoffwechsel von Testosteronglucuronid wird also ein bevorzugter "5 β -Weg" eingeschlagen, während aus freiem Testosteron 5 α - und 5 β -hydrierte Steroidmetaboliten entstehen.

Neben diesen grundsätzlichen Untersuchungen über den Stoffwechsel von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten an Einzelpersonen liegen zahlreiche in vivo-Untersuchungen über die Glucuronierung von Testosteron bei Patienten mit Lebererkrankungen vor.

Eine verminderte 17-Ketosteroidausscheidung im 24h-Urin bei Patienten mit Lebercirrhose, akuter Virushepatitis und Verschlussikterus wurde übereinstimmend schon früh von DOHAN et al. (1952) und PETERSON et al. (1960) mitgeteilt.

VERMEULEN et al. (1969) konnten bei Patienten mit Lebercirrhose neben einer erniedrigten Sekretionsrate von Testosteron eine verminderte Ausscheidung von Testosteronglucuronid nachweisen.

KARL und Mitarbeiter (1970; 1971) fanden bei 10 Patienten mit histologisch gesicherter, kompensierter Lebercirrhose nach Injektion von (4- ^{14}C)-Testosteron eine signifikant niedrigere Ausscheidung von Testosteron-, Androsteron- und Ätiocholanolonglucuronid im Urin als bei gesunden Probanden. BERCOVICI et al. (1971) verabreichten 6 Patienten mit alkoholischer Lebercirrhose intravenös radioaktiv markiertes Testosteron und fanden innerhalb der ersten 6 Stunden nach Injektion eine deutlich niedrigere Metabolitenausscheidung im Urin als bei gesunden Vergleichspersonen. Während von den Normalpersonen 98% der verabreichten Testosteronmenge nach 6 Stunden als Glucuronide und Sulfate ausgeschieden wurden, waren es bei den Patienten mit Lebercirrhose nur 65 %. Nach 96 Stunden hatten beide Gruppen prozentual gleichviel konjugierte Steroide ausgeschieden.

Im Gegensatz zu den zahlreichen in vivo-Untersuchungen über die Glucuronierung von Testosteron beim Menschen ist uns nur eine in vitro-Arbeit bekannt geworden, die sich mit der Glucuronierung von Testosteron in der menschlichen Leber beschäftigt.

RAO et al. (1970) inkubierten die Zytosolfraction einer intraoperativ gewonnenen Lebergewebsprobe mit ^{14}C -Testosteron und konnten die Bildung von ^{14}C -Testosteronglucuronid nachweisen.

II. Fragestellung

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß der Stoffwechsel von Testosteron zu freien, nicht konjugierten Metaboliten in pathologisch verändertem Lebergewebe, so in Proben von Zirrhose, Fettleber und chronischer Hepatitis, nicht anders abläuft als in normalem Lebergewebe, jedenfalls nicht in jedem Fall eindeutig erniedrigt ist (UNTERBURGER, 1973). In vivo-Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß bei Leberkranken im Urin Testosteron und Testosteronmetaboliten in verringertem Maß ausgeschieden werden (KARL et al., 1970; 1971). Testosteron und Testosteronmetaboliten werden jedoch im Harn nur zu einem geringen Teil als freie Metaboliten, vorwiegend jedoch in konjugierter Form als Glucuronide und Sulfate ausgeschieden. Es ist deshalb möglich, daß bei Leberkranken nicht der Stoffwechsel zu freien, jedoch zu konjugierten Metaboliten gestört ist. Ausgehend von diesen Überlegungen haben wir uns folgende Fragen gestellt und diese zu beantworten versucht:

1. Läßt sich in vitro eine Glucuronierung von Testosteron in menschlichen Lebergewebsschnitten nachweisen und welche Metaboliten werden vorwiegend glucuroniert?
2. An welche subzellulären Strukturen ist die Glucuronierung von Testosteron und Testosteronmetaboliten gebunden?
3. Welchen Einfluß haben Inkubationsdauer und Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten auf den Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten?
4. Läßt sich in vitro mit perkutan gewonnenen Leberstanzylindern eine Glucuronierung von Testosteron nachweisen?

5. Unterscheidet sich der Stoffwechsel von Testosteron zu freien und glucuronierten Metaboliten in pathologisch verändertem Lebergewebe von dem in normalem Lebergewebe?
6. Läuft der Stoffwechsel von Testosteron zu freien und glucuronierten Metaboliten in Abhängigkeit vom Ausmaß der Leberzellschädigung unterschiedlich ab?

III. Versuchsteil

1. Prinzip des methodischen Vorgehens

Gewebeschnitte und subzelluläre Fraktionen von intraoperativ erhaltenem Lebergewebe sowie perkutan gewonnene Leberstanzzyylinder wurden mit ^{14}C -Testosteron bzw. ^3H -Testosteron inkubiert. Die radioaktiv markierten Androgene und deren freie bzw. glucuronisierte Metaboliten wurden dann aus dem Inkubationsmedium extrahiert und anschließend gaschromatographisch aufgetrennt. Zur Messung der Aktivität der markierten Androgene wurde das Trägergas entweder durch einen Gasdurchflußreaktor geleitet oder mit einem Gasfraktionskollektor fraktioniert, die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Steroide kondensiert und dann die Aktivität der Steroide in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gemessen. Ein Schema des methodischen Vorgehens zeigt die Abbildung 1.

LEBERGEWEBE

6 - 100 mg

INKUBATION

0.3 - 3.0 ml Puffer

Wasserstoff- und glucuronsäureübertragende Cofermente

^{14}C -Testosteron bzw. ^3H -Testosteron

EXTRAKTION

1) Freie Steroide

2) Glucuronisierte Steroide

VORREINIGUNG

GASCHROMATOGRAPHIE

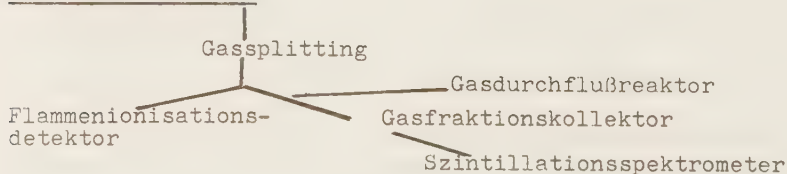


Abb. 1 : Übersicht über die einzelnen methodischen Schritte der Inkubationsversuche mit Lebergewebe

2. Steroid-Reinsubstanzen

a) Radioaktiv markierte Steroide

(4- ^{14}C)-Testosteron (spez. Aktivität 57.5 mC/mMol)

(1,2- ^3H)-Testosteron (spez. Aktivität 40 C/mMol)

(1,2- ^3H)-Testosteron - β -D- Glucuronid (spez. Aktivität
40 C/mMol)

Die Steroide wurden von der Firma New England Nuclear Corporation (NEN), Niederlassung Dreieichenhain bei Frankfurt/Main bezogen.

b) Nicht radioaktiv markierte Steroide

Androst-4-en-3,17-dion = Δ^4 -Androstendion = Androstendion = Δ^4 -A

Androst-4-en-17 β -ol-3-on = Testosteron = T

Androst-4-en-17 α -ol-3-on = Epitestosteron = e-T

5 α - Androstan-3,17-dion = 5 α - Androstandion = 5 α -Adion

5 β - Androstan-3,17-dion = 5 β - Androstandion = 5 β -Adion

5 α - Androstan-17 β -ol-3-on = 5 α - Dihydrotestosteron =

5 α - DHT

5 β - Androstan-17 β -ol-3-on = 5 β - Dihydrotestosteron =

5 β - DHT

5 α - Androstan-3 α -ol-17-on = 5 α ,3 α - Androsteron = Androsteron = 5 α - A

5 β -Androstan-3 α -ol-17-on = 5 β ,3 α - Androsteron = Ätiocholanolon = 5 β - A

5 α - Androstan-3 β -ol-17-on = 5 α ,3 β - Androsteron = Epiandrosteron

5 α - Androstan-3 α ,17 β -diol = 5 α ,3 α - Androstandiol = 5 α -Adiol

5 β - Androstan-3 α ,17 β -diol = 5 β ,3 α - Androstandiol = 5 β -Adiol

5 α - Androstan-3 β ,17 β -diol = 5 α ,3 β - Androstandiol

5 α - Androstan-3 α -ol,17-on-3-glucuronid = Androsteron -3-glucuronid

5 α - Androstan-3 β -ol,17-on-3-glucuronid = Epiandrosteron -3-glucuronid

5 β - Androstan-3 α -ol,17-on-3-glucuronid = Ätiocholanolon -3-glucuronid

17 β - Hydroxyandrost-4-en-3-on-17-glucuronid = Testosteron-17-glucuronid

Diese Substanzen wurden von der Steroid-Reference-Collection, London, zur Verfügung gestellt. Größere Mengen einzelner Steroide wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen, bzw. in großzügiger Weise von der Fa. Schering, Berlin zur Verfügung gestellt.

3. Reagenzien

Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD)	Reinheitsgrad II
Nicotinamid-adenin-dinucleotid, red. (NADH)	"
Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP)	"
D-Glucose-6-phosphat, Di-Natriumsalz = Glucose - 6- P	
D-Glucose-6-phosphat-dehydrogenase = Glucose-6-P-dehydrogenase	"
Adenosintriphosphat (ATP)	
Uridin-5-diphosphoglucuronsäure (UDP-Glucose)	
Uridin-5-diphospho-N-acetyl-glucosamin = UDP - N-acetyl-glucosamin	
D-Glucose 50 %	

Diese Substanzen wurden mit Ausnahme der D-Glucoselösung von der Fa. Boehringer, Mannheim, bezogen, die D-Glucose aus der Apotheke der Universitätskliniken, München.

Magnesiumtrisilikat, Korngröße 60-100 mesh/0.15-0.25 mm ("Florisol"), Fa. Serva, Heidelberg

Aluminiumoxyd, stand., Aktivitätsstufe III, Fa. Merck, Darmstadt

Gaschrom Q, 80-100 mesh, mit 1% Silicon XE 60 beschichtet, Fa. Applied Science Lab., State College, PA., USA

Silylierungsmittel:

Pyridin	0.02 ml	"Uvasol" Fa. Merck, Darmstadt
Hexamethyldisilazan	0.20 ml	Fa. Schuchardt, München
Trimethylchlorsilan	0.02 ml	Fa. Serva, Heidelberg

Diese Substanzen werden in dieser Reihenfolge gemischt.

4. Puffer-, Inkubations- und Reaktionslösungen

KREBS-HENSELEIT-RINGER-PHOSPHAT-Lösung (KHR-Phosphat-Lösung)

nach den Angaben von KREBS und HENSELEIT (1932) und
SCHRIEFERS et al. (1971 a).

Stammlösung

NaCl	(0.154 m)	9.00 g/l	100.0 ml	p.a. Fa.Merck
KCl	(0.154 m)	11.50 g/l	4.0 ml	"
CaCl ₂ x2 (H ₂ O)	(0.11 m)	16.15 g/l	3.0 ml	"
MgSO ₄ x7 (H ₂ O)	(0.154 m)	38.20 g/l	1.0 ml	"

bzw.

MgCl ₂ x6 (H ₂ O)	(0.154 m)	31.30 g/l	1.0 ml	"
---	-----------	-----------	--------	---

Diese Substanzen wurden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Phosphatpuffer - Lösung

Na₂HPO₄x2 (H₂O) (0.100 m) 17.8 g mit etwa 900 ml H₂O
auffüllen, dann mit etwa 20 ml 1 n HCl auf pH 7.4 einstellen
und mit H₂O auf 100 ml auffüllen.

Zur Herstellung der Inkubationslösung werden 25.3 ml Stamm
lösung mit 4.7 ml Phosphatpuffer zusammengegeben.

TRISPUFFER

Zur Herstellung einer 0.1 m Pufferlösung werden 12.11 g Tris-
(hydroxymethyl)-aminomethan (Fa. Merck, Darmstadt) in 1000 ml
H₂O gelöst und mit 1 n HCl auf pH 7.4 eingestellt.

Inkubationslösung 1

KREBS-HENSELEIT-RINGER-Phosphat-Lösung mit Zusatz von D-Glucose (10 mM), MgCl_2 statt MgSO_4 (s.S. 10), ohne Cofermente

Inkubationslösung 2

MgSO_4 statt MgCl_2 (s.S. 10), im übrigen wie Inkubationslösung 1

Inkubationslösung 3

TRIS-Puffer, im übrigen wie Inkubationslösung 1

Inkubationslösung 4

KHR-P-Lösung mit Zusatz von D-Glucose (10 mM), MgCl_2 statt MgSO_4 , ATP (2 mM), UDP-Glucuronat (1.1 mM), UDP-N-acetylglucosamin (2 mM), NAD und NADH (je 0.6 mM), NADP (0.54 mM), Glucose-6-P (2.3 mM) und Glucose-6-P-dehydrogenase (1 E/ml)

Inkubationslösung 5

MgSO_4 statt MgCl_2 (s.S. 10), im übrigen wie Ink.lösung 4

Inkubationslösung 6

KHR-P-Lösung mit Zusatz von D-Glucose (10 mM), MgCl_2 statt MgSO_4 (s.S. 10), ATP (2 mM), UDP-Glucuronat (1.1 mM), UDP-N-acetyl-glucosamin (2 mM)

Inkubationslösung 7

KHR-P-Lösung mit Zusatz von D-Glucose (10 mM), MgCl_2 statt MgSO_4 (s.S. 10), NADP (0.54 mM), Glucose-6-P (2.3 mM) und Glucose-6-P-dehydrogenase (1 E/ml)

Saccharoselösung zur Zellfraktionierung

Um eine 0.25 m Saccharoselösung herzustellen, werden 42.7 g Saccharose "zur Dichtezentrifugation" in 500 ml H_2O gelöst.

- 17 -

Szintillationsflüssigkeit zur Radioaktivitätsmessung
wässriger Lösungen (BRAY'sche Lösung)

2-5-Diphenyl-oxazol (PPO)	8.0 g
1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenylloxazol)-Benzene (POPOP)	0.6 g
Fa. Packard, Frankfurt/Main	
Naphtalin, Fa. Merck, Darmstadt	100.0 g
Äthylenglykoll, Fa. Merck, Darmstadt	40.0 ml
Methanol dest., Fa. Merck, Darmstadt	200.0 ml

Diese Reagenzien werden mit Dioxan (P.a., Fa. Merck, Darmstadt) auf 2000 ml aufgefüllt.

Szintillationsflüssigkeit zur Radioaktivitätsmessung
wasserfreier Lösungen

2-5-Diphenyl-oxazol (PPO)	4.0 g
1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenylloxazol)-Benzene (POPOP)	0.1 g
Fa. Packard, Frankfurt/Main	

werden mit Toluol (p.a. Fa. Merck, Darmstadt) auf 1000 ml aufgefüllt.

Hydrolyseansatz:

Die wässrige Phase nach der ersten Florisilssäule (20 ml) wurde mit 2 ml Acetatpuffer (0.2 M CH_3COOH + 0.2 N Na-acetat Lösung 1:1, p.a. Fa. Merck, Darmstadt), 2 ml Ketodalösung (= 5000 IE/ml) versetzt, und es wurden 12 nicht radioaktiv markierte Androgene (je 50 μg , s.S. 16) zugegeben. Danach stellt man den Hydrolyseansatz mit 50 %iger CH_3COOH (p.a. Fa. Merck, Darmstadt) auf pH 4.6 ein und inkubiert diesen 24 Stunden bei 47°C, um so die glucuroniierten Androgene und deren Metaboliten zu hydrolysieren.

5. Apparate und Hilfsgeräte

Schüttelinkubator nach Warburg: Modell V 166, Fa. Braun, Melsungen

Homogenisator nach Potter-Elevhøj, Modell 719, mit Glaszylinder und Teflonkolben, Fa. Braun, Melsungen

Gaschromatographen: Modell: 1400 und 7600/7800
Fa. Packard, Frankfurt/M

Gasfraktionskollektor: Modell: 850
Fa. Packard, Frankfurt/M

Flüssigkeitsszintillationszähler, "Tricarb", Modell: 2002
Fa. Packard, Frankfurt/M

Spinco - Ultrazentrifuge: Modell L2, 65b, Rotor 75 TI,
Fa. Beckmann, München

Spinco - Ultrazentrifuge: Modell A, Rotor 40
Fa. Beckmann, München

Durchflußreaktor RGC 170 mit Proportionalzählrohr
Fa. Perkin-Elmer

Tischrechner Programma 101
Fa. Olivetti

Hamiltonspritze: Modell CR 700 - 20,
Fa. Hamilton & Co, Whittier, Californien, USA

Pasteurpipetten: $\emptyset$: 0.5 cm, Länge: 10.0 cm; No.: H 55669
Fa. Harshaw Chemie N.V., Utrecht, Holland

Die Pipetten werden mit 0.6 g Florisil bzw. 1.0 g Aluminiumoxyd gefüllt und als kleine Säule zur Adsorptionsextraktion bzw. zur Reinigung der Extrakte verwendet.

6. Arbeitsvorschrift

a) Gewinnung des Lebergewebes

Leberstanzzyylinder wurden von Leberblindbiopsien erhalten, die ausschließlich aus klinischer Indikation wegen des Verdachtes auf eine Lebererkrankung durchgeführt wurden. Die Leberstanzzyylinder wurden sofort nach der Punktion geteilt und histologisch untersucht bzw. inkubiert.

Das Lebergewebe für die Gewebeschnitte und für die Zellfraktionierung (ca. 2 g) wurde bei Cholecystektomien in der Chirurgischen Universitätsklinik München (Dir. Prof. Dr. G. Heberer) gewonnen.

Die Leberstanzzyylinder bzw. das intraoperativ gewonnene Lebergewebe wurde sofort in eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung gegeben und innerhalb 15 min. zur Inkubation gebracht. Auch die operativ gewonnenen Lebergewebsproben wurden histologisch untersucht.

An dieser Stelle sei folgenden Herren für ihre bereitwillige Unterstützung bei der Gewebegewinnung gedankt:

Herrn Professor Dr.J. Eisenburg, I. Medizinische Klinik der Universität München und seinen Mitarbeitern,

Herrn Dr.P. Kiefhaber, II. Medizinische Klinik der Universität München,

Herrn Professor Dr.G. Heberer, Chirurgische Klinik der Universität München und seinen Mitarbeitern

b) Zellfraktionierung

Menschliches Lebergewebe (je etwa 2 g) wurde mit der Schere zerkleinert und anschließend in 8.0 ml eisgekühlter 0.25 m Saccharoselösung im Glashomogenisator homogenisiert. Zur gemeinsamen Abtrennung von Kernen und Mitochondrien wurde das Vollhomogenat nach den Angaben von SCHRIEFERS et al. (1971 b) 20 min. bei 10 000 g in einer Spinco-Zentrifuge L 2,65 b bei 2°C zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen. Der 10 000 g-Überstand wurde dann 60 min. bei 100 000 g bei 2°C wiederum in einer Spinco-Zentrifuge L2,65 b zentrifugiert. Der Überstand wurde als Zytosolfraktion inkubiert. Das Sediment wurde nochmals in 8.0 ml 0.25 m Saccharoselösung resuspendiert und wiederum bei 100 000 g 60 min. bei 2°C zentrifugiert. Das Sediment wurde als sog. Mikrosomenfraktion inkubiert. 1.0 ml der jeweils inkubierten Fraktion enthielt somit immer die Zellbestandteile von 0.25 g Lebergewebe.

c) Inkubationsbedingungen

Die Lebergewebsschnitte wurden gewogen und jeweils 100 mg 2 Stunden bei 37°C mit 1.4×10^{-10} Mol (1,2-³H)-Testosteron (spezifischen Aktivität: 40 C/mMol) bzw. mit 1.7×10^{-9} Mol (4-¹⁴C)-Testosteron (spez. Aktivität: 57.5 mC/mMol) in 3.0 ml Inkubationslösung im Warburgapparat unter Luftatmosphäre inkubiert. Es wurden jeweils Doppelansätze mit den Inkubationslösungen Nr. 1, 2, 3, 4, 5 und 6 (mit MgSO₄ bzw. MgCl₂-Ionen und unterschiedlichem Cofermentzusatz, siehe Versuchsteil, Seite 11) angefertigt.

Das radioaktiv markierte Testosteron wurde, in Äthanol gelöst, in einen Glaskolben pipettiert, unter Stickstoff getrocknet und anschließend mit dem jeweiligen Inkubationsmedium durch 30-minütiges Schütteln in wässrige Lösung gebracht.

Die Leberstanzzyylinder wurden gewogen (Gewicht 6 - 10 mg) und mit 1.7×10^{-9} Mol ($4\text{-}^{14}\text{C}$)-Testosteron (spez. Aktivität: 57.5 mC/mMol) bzw. 1.4×10^{-10} Mol ($1,2\text{-}^3\text{H}$)-Testosteron (spez. Aktivität: 40 C/mMol) in 0.3 ml der Inkubationslösungen 4 und 6 (s.S. 11) inkubiert. Bei einigen Versuchen wurden die Leberstanzzyylinder vor der Inkubation lyophilisiert oder homogenisiert. Inkubiert wurde 2 Stunden bei 37° im Warburgapparat bei einer Schüttelfrequenz von 100/Minute.

Die Leberzellfraktionen wurden analog den Lebergewebeschnitten 0.5 oder 2 Stunden mit den Inkubationslösungen 4, 5, 6 und 7 jeweils in Doppelansätzen inkubiert.

Allen Ansätzen mit Lebergewebe bzw. subzellulären Fraktionen liefen Kontrollansätze parallel, die bis auf den Gewebszusatz die gleiche Zusammensetzung hatten wie die Ansätze mit Gewebe.

d) Aufarbeitung der Inkubationsansätze

Nach der Inkubation wurde das Inkubat bis zur weiteren Aufarbeitung bei -30° C eingefroren. Nach dem Auftrauen wurde jedem Inkubat vor der nachfolgenden Extraktion 1/100 Volumen zur Messung der Gesamtradioaktivität entnommen. Jedem Inkubat wurden anschließend folgende nicht radioaktiv markierte Steroidreinsubstanzen (je 50 μg , zusammen in 100 μl Äthanol gelöst) als interne Standards zugegeben: Testosteron, Δ^4 -Androstendion, Epitestosteron, 5α -Androstandion, 5β -Androstandion, 5α -Dihydrotestosteron, 5β -Dihydrotestosteron, 5α -Androsteron, 5β -Androsteron, $5\alpha,3\alpha$ -Androstandiol, $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol und $5\alpha,3\beta$ -Androstandiol.

Dann wurden die Ansätze, sofern es sich nicht um subzelluläre Fraktionen handelte, im Inkubationsmedium homogenisiert und das Homogenat zur "Adsorptionsextraktion" auf eine mit 20 ml

Auqua dest. vorgewaschene und mit 0.6 g Florisil beschickte Glassäule (Durchmesser: 0.5 cm) gegeben. (Die im Inkubat enthaltenen, nicht glucuronierten Steroidhormone Testosteron und dessen Metaboliten sowie die internen Standards werden dabei aus der wässrigen Lösung an Florisil adsorbiert, die mit Glucuronsäure konjugierten Steroide erscheinen im wässrigen Durchlauf). Das Florisil wurde in der Säule mit nachgereinigtem Stickstoff getrocknet und anschließend die freien, nicht konjugierten Steroide mit 4 mal 1 ml redest. Äthanol eluiert und anschließend an einer mit 1.0 g Aluminiumoxyd beschickten Glassäule (Durchmesser: 0.5 cm) nachgereinigt. Diese Extraktion erfolgte nach den Angaben von WIEDEMANN et al. (1970).

1/100 Volumen des äthanolischen Eluats (Eluat 1 = Eluat der freien Steroide von der ersten Florisilsäule) wurde zur Messung der Aktivität abgezweigt, der Rest mit Stickstoff getrocknet. Dem Rückstand wurden 0.2 ml des Silylierungsmittels (s.S. 9) zugesetzt, nach 16 Stunden Reaktionszeit bei Zimmertemperatur mit Stickstoff getrocknet und der Rückstand in 25 µl destilliertem Iso-Octan gelöst und gaschromatographisch aufgetrennt.

Die im Inkubat enthaltenen mit Glucuronsäure konjugierten Steroide, die im wässrigen Durchlauf (Durchlauf 1 = Durchlauf der ersten Florisilsäule) erscheinen, wurden einer Hydrolyse mit β -Glucuronidase unterzogen (s.S. 12), nachdem ebenfalls ein aliquoter Teil zur Bestimmung der Wiederfindung der Radioaktivität entnommen worden war. Das wässrige Hydrolysat wurde dann auf eine zweite Florisilsäule gegeben und die hydrolysierten Steroide adsorbiert, während eventuell gebildete Steroidsulfate erneut im wässrigen Durchlauf (Durchlauf 2 = Durchlauf der zweiten Florisilsäule) erschienen, aber nicht weiter bearbeitet wurden. Die hydrolysierten Steroide wurden mit Äthanol eluiert (Eluat 2 = Eluat der hydrolysierten Steroide von der zweiten Florisilsäule), an einer Aluminiumoxydsäule (Durchmesser: 0.5 cm) nachgereinigt und mit Stickstoff getrocknet. Vor der Einengung wurde ein aliquoter Teil des Eluats zur Bestimmung der Radioaktivität

abgezweigt. Ein Schema der Extraktion und der Separierung freier von glucuronierten Androgenen findet sich in Abbildung 2.

e) Gaschromatographie

Vor der Gaschromatographie der gelösten Proben wurden jeweils die Funktionsfähigkeit und Dichtigkeit des Gaschromatographiesystems mit der Wiederfindung einer bekannten Menge silyliertem ($4\text{-}^{14}\text{C}$)-Testosteron geprüft. Die Bedingungen der Gaschromatographie waren folgende: Glassäule: Länge 9 ft, Innendurchmesser 2.5 mm. Säulenfüllmaterial: 1% XE 60 auf Gaschrom Q. Trägergas: Nachgereinigter Stickstoff. Gasfluß: 40-60 ml/min. Einlaßdruck: 10-20 psig. Auslaßdruck: 0 psig. Säulentemperatur: Isotherm 220°C oder temperaturprogrammiert 170 - 225°C bei einer Temperaturerhöhung von 0.7 - $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Ein- und Auslaßtemperatur: 225°C . Detektortemperatur: 230°C . Flammenionisationsdetektor: Wasserstofffluß 40 ml/min., Luftfluß 600 ml/min. Detektorspannung: 50 V.

Zur Gaschromatographie wurden 5 aus 25 μl des in Iso-Octan gelösten, silylierten Extraktes auf die 1%-ige XE-60-Säule gespritzt und weitere 5 μl zur Messung der Gesamtradioaktivität in ein Meßglas gegeben. Das Trägergas und die gasförmigen Steroide bzw. Steroidäther wurden nach der Passage durch eine 1% XE-60-Säule mittels eines Gassplitters im Verhältnis 1:5 geteilt. 1/6 des Gases wurde einem Flammenionisationsdetektor zur Registrierung der zugesetzten, nicht radioaktiv markierten Steroide zugeleitet (siehe Abb.3). Die restlichen 5/6 des Gases wurden entsprechend den Retentionszeiten der internen Standards mittels eines Gasfraktionskollektors fraktioniert und die in den Gasfraktionen enthaltenen Steroide an Watte in Gasröhrchen kondensiert.

Bei einigen Versuchen wurden nach "splitting" 5/6 des Trägergases nicht dem Gasfraktionskollektor zugeführt, sondern durch einen Durchflußreaktor geleitet und die Radioaktivität

LEBERSTANZZYLINDER

6 - 10 mg

INKUBATION

0,3 ml KHR-Phosphat-Puffer
D-Glukose, NAD, NADH, NADP,
D-Glukose-6-Phosphat,
D-Glukose-6-Phosphat-ONG,
ATP, UDP-Glukuronat,
DE-N 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100
2 h, 37°C, pH 7,4

TRENNUNG DER FREIEN UND
GLUKURONIERTEN STEROIDE

Florisilsäule

HYDROLYSE

β -Glukuronidase

REINIGUNG

Aluminiumoxydsäule

GASCHROMATOGRAPHIE

MSI-Ather. 15 RE-60, 170-225°C

AKTIVITÄTSMESSUNG

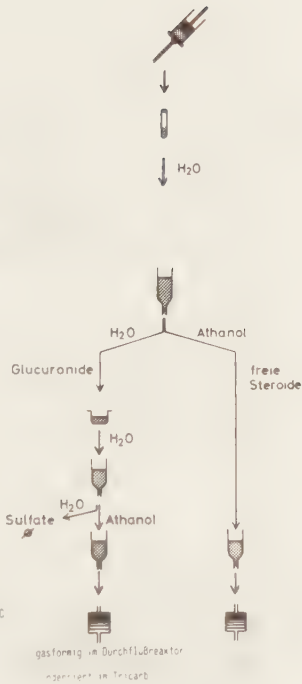


Abb.2: Übersicht über die einzelnen methodischen Schritte der Inkubationsversuche mit Leberstanzylinder bzw. Lebergewebe.

der Steroide in gasförmigem Zustand gemessen. Abbildung 4 zeigt als Beispiel die gaschromatographische Auftrennung eines Gemisches von nicht radioaktiv markiertem Testosteron und (1,2-³H)-Testosteron mit simultaner Aufzeichnung von Massenpeak und Radioaktivitätspeak durch einen Doppelkanalschreiber. Als Beispiel einer Messung im Durchflußreaktor ist in Abbildung 5 die gaschromatographische Auftrennung der Glucuronidfraction eines Inkubationsversuches mit einem Leberstanzzylinder nach β -Glucuronidasehydrolyse dargestellt.

Oben die Massenpeaks von 12 Referenzsteroiden, die nach der Inkubation als interne Standards den Extrakten zugesetzt wurden und unten die Verteilung der Tritiumaktivität, gemessen in dem Durchflußreaktor und synchron geschrieben.

Als weiteres Beispiel einer Messung im Durchflußreaktor findet sich in Abbildung 6 die gaschromatographische Auftrennung der Fraktion der freien Steroide eines Inkubationsversuches mit einer Zytosolfraction von humanem Lebergewebe.

f) Radioaktivitätsmessung

Die ¹⁴C- bzw. ³H-Aktivität in den einzelnen Fraktionen wurde in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gemessen. Dazu wurde die Watte aus den einzelnen Röhrchen direkt in die Meßgläschen gestoßen und 1.0 ml Äthanol und 10.0 ml Szintillationsflüssigkeit (s.S. 12) dazugegeben. Die Einstellung des Szintillationszählers wurde folgendermaßen gewählt: Kanal I: Baseline discriminator A = 180, upper discriminator B = 1000; gain = 8.5 %. Kanal II: Baseline discriminator C = 50, upper discriminator D = 300; gain = 25 %. Meßdauer: 10 min/Probe.

Die aliquoten Anteile, die während der Extraktion entnommen wurden, wurden mit 10.0 ml Bray'scher Szintillationsflüssigkeit (s.S. 12) in ein Meßglas gegeben und dann ebenfalls im Szintillationsspektrometer 10 min. gemessen (Ergebnisse siehe im Anhang).

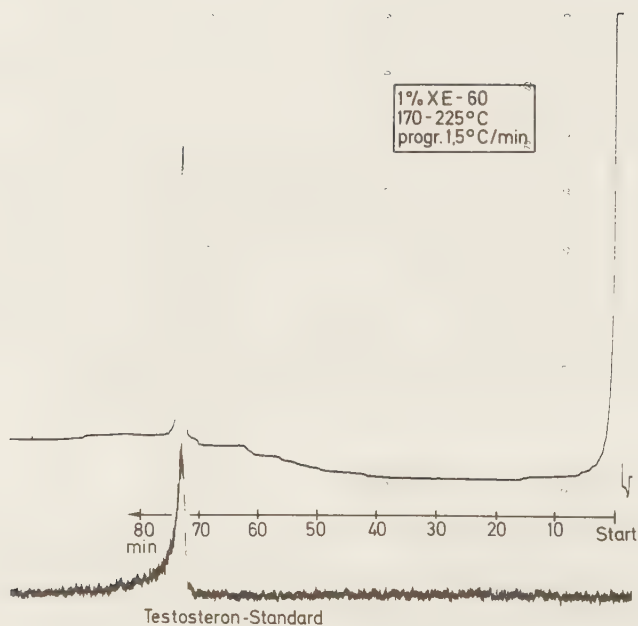


Abb.4: Gaschromatographische Auftrennung von Testosteron und (1,2- ^3H)-Testosteron als TMS-Derivate. Oben der Massenpeak von Testosteron, unten der Radioaktivitätspeak von ^3H -Testosteron.

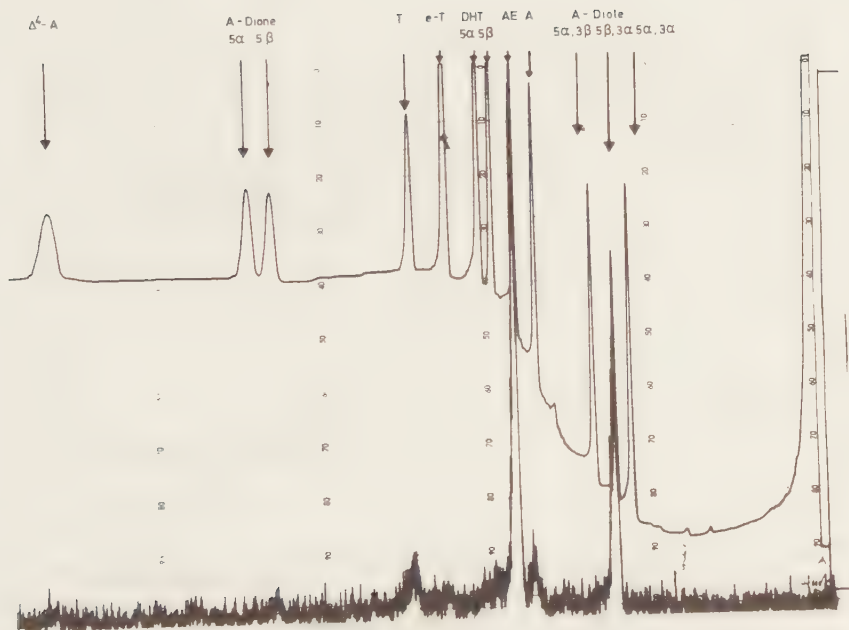


Abb.5: Radiogaschromatographische Auftrennung der glucuro-nierten Testosteronmetaboliten nach Inkubation eines Leberstanzzyllinders mit (1,2-³H)-Testosteron und anschließender β -Glucuronidasehydrolyse. Näheres siehe Text.

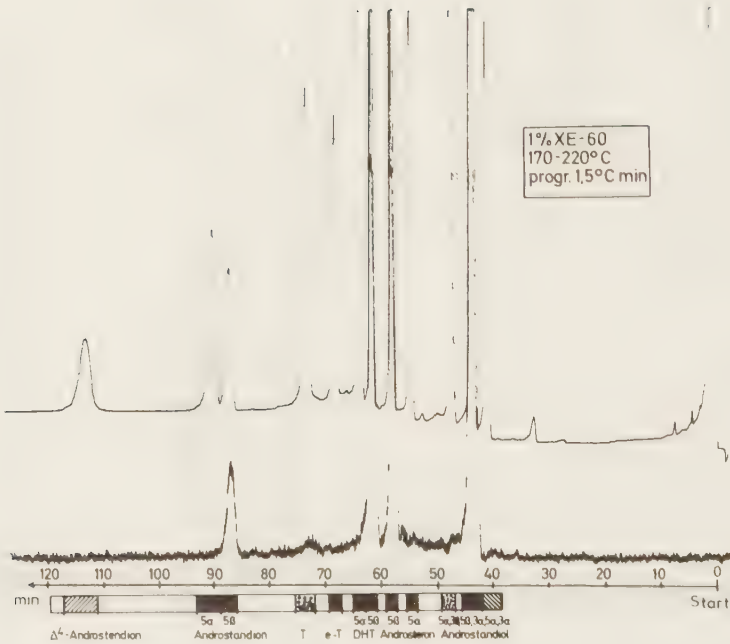


Abb.6: Radiogaschromatographische Auftrennung der freien Testosteronmetaboliten nach Inkubation einer Leberzytosolfraktion mit (1,2-³H)-Testosteron.

g) Berechnung

Aus der Summe der ^{14}C - bzw. ^3H -Impulse in den einzelnen Zonen des Kontrollansatzes wurde die prozentuale Verteilung der ^{14}C - bzw. ^3H -Impulse in den einzelnen Fraktionen berechnet. Aus der Summe der ^{14}C - bzw. ^3H -Impulse in den einzelnen Fraktionen des Hauptwertes (Ansatz mit Lebergewebe) wurde die prozentuale Verteilung der ^{14}C - bzw. ^3H -Impulse errechnet. Dann erfolgte eine Korrektur der Werte des Hauptwertes mit denen des Kontrollansatzes und es wurde der Stoffwechsel von ^{14}C -Testosteron bzw. ^3H -Testosteron zu freien und glucuro-nierten Metaboliten kalkuliert.

Die Berechnungen wurden an einem Magnetkarten-Tischrechner (Olivetti Programma 1001) durchgeführt.

7. Beurteilung der Methoden

a) Gewebebegewinnung

Der Durchmesser der Leberstanzzyylinder lag in der Größenordnung von 0.3 - 0.5 mm. Histologisch zeigte sich, daß der Dicke eines Stanzzyinders etwa 30 Zellagen entsprechen. Nur die beiden äußersten Zellagen zeigten unter dem Mikroskop Rupturercheinungen. Somit entspricht der Stanzzyylinder einem Gewebe und nicht einem Homogenat.

Die Gewebeschnitte wurden nach den Angaben von SCHRIEFERS et al. (1971 a) hergestellt. Die Dicke der Schnitte betrug ebenfalls 0.3 - 0.5 mm, so daß eine hinreichende Sauerstoffversorgung aus dem umgebenden Inkubationsmedium gewährleistet war.

b) Zellfraktionierung

Auch die Zellfraktionierung erfolgte nach den Angaben von SCHRIEFERS et al. (1971 b), um die mit subzellulären Fraktionen menschlicher Leber gewonnenen Versuchsergebnisse mit den Untersuchungsergebnissen von Rattenleber vergleichen zu können.

c) Inkubationsbedingungen

Die Inkubation von Leberstanzzyclindern, Leberschnitten und Leberzellfraktionen erfolgte nach den Angaben von SCHRIEFERS et al. (1966) und wurde nach einigen orientierenden Versuchen mit humaner Leber modifiziert bzw. erweitert durch Zusatz von NAD, NADH, NADP, Glucose - 6 - P und Glucose - 6 - P - dehydrogenase, da es durch Zugabe von wasserstoffübertragenden Cofermenten zum Inkubationsmedium zu einer erheblichen Steigerung des Stoffwechsels von Testosteron kam.

Um zu klären, ob die Zellstruktur des Stanzzyclinders während der Inkubation verändert wird, wurden Zylinder geteilt und die eine Hälfte sofort fixiert, die andere 2 Stunden inkubiert und dann erst fixiert und anschließend histologisch untersucht. Es fand sich histologisch kein Unterschied zwischen dem sofort und dem erst nach der Inkubation fixierten Stanzzyclinder und es konnte somit eine Veränderung der Gewebestruktur der Leberstanzzyclinder während der Inkubation ausgeschlossen werden.

Auch der Frage, ob eventuell bei den gegebenen Inkubationsbedingungen aus der Leberzelle testosteronabbauende Enzyme austreten, wurde nachgegangen. Ein Leberstanzzyclinder wurde ohne Zusatz radioaktiv markierter Steroide 2 Stunden inkubiert, dann der Gewebszyclinder entfernt, ^{14}C -Testosteron zugegeben und nochmals 4 Stunden nachinkubiert. Die Aktivitätsverteilung dieses Versuchsextraktes unterschied sich nicht von den entsprechenden Kontrollansätzen ohne Gewebszugabe. Der mit einem Leberstanzzyclinder nachgewiesene Stoff-

wechsel des zugesetzten Androgens ^{14}C -Testosteron muß also unter den gegebenen Inkubationsbedingungen intrazellulär oder zumindest an Zellstrukturen stattfinden. Es dürfte also sehr unwahrscheinlich sein, daß ein Steroidstoffwechsel durch aus der Leberzelle in das Inkubationsmedium austretende Enzyme stattfand.

Ein Einfluß von steroidabbauenden Enzymsystemen in Bakterien auf den Steroidstoffwechsel konnte bei Inkubationszeiten von 0.5 - 2 Stunden weitgehend ausgeschlossen werden, da gemäß früheren Untersuchungen bei Inkubationszeiten bis zu 4 Stunden in Kontrollansätzen wie auch in Lebergewebsansätzen Keimzahlen von 0 - 8000/ml Inkubat gefunden wurden, die zu keinem nachweisbaren Testosteronstoffwechsel führten. Erst bei Inkubationszeiten von 24 Stunden und mehr konnten Keimzahlen von 10 Mill./ml Inkubat gemessen werden und in entsprechenden Ansätzen mit derartig hohen Keimzahlen fand auch ohne Zusatz von Lebergewebe ein geringer Abbau von ^{14}C -Testosteron zu ^{14}C - Δ^4 -Androstendion und ^{14}C -5 α -Androstandion statt. Um auch bei kürzeren Inkubationszeiten (0.5 - 2.0 h) in jedem Fall einen Steroidstoffwechsel durch Bakterien sicher auszuschließen, wurden neben den Ansätzen mit Lebergewebe immer Kontrollansätze mit völlig gleichen Inkubationsbedingungen, aber ohne Gewebe, mitinkubiert und ebenso extrahiert und gaschromatographisch aufgetrennt wie die Gewebsansätze.

d) Adsorptionsextraktion von Testosteron, Testosteronglucuronid und deren Metaboliten

Nach den Angaben von WIEDEMANN et al. (1970) werden von den im Inkubationsmedium enthaltenen radioaktiv markierten Androgenen Testosteron, Testosteronglucuronid und deren Metaboliten beim ersten Extraktionsschritt (siehe Abb.2, S. 19) nur die freien Steroide an Florisil adsorbiert. Die während der Inkubation gebildeten Steroidkonjugate Testosteron-, Andro-

standiol-, Androsteron- und Ätiocholanolonglucuronid bzw. weitere mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure konjugierte Steroidmetaboliten erscheinen im wässrigen Durchlauf 1 (wässriger Durchlauf der ersten Florisilsäule). Um die Angaben von WIEDEMANN et al. zu überprüfen, wurden folgende methodische Versuche durchgeführt:

Je 180 µg nicht radioaktiv markiertes Androsteronglucuronid und Ätiocholanolonglucuronid wurden in 20 ml Aqua dest. gelöst und auf eine Florisilsäule gegeben. Der wässrige Durchlauf 1 und das äthanolische Eluat 1 (Eluat der ersten Florisilsäule) wurden mit β -Glucuronidase hydrolysiert (siehe Versuchsteil, Seite 12). Das Hydrolysat wurde dann erneut auf eine Florisilsäule gegeben und mit 4 x 1 ml Äthanol eluiert. Aliquote Teile von Eluat 1 und Eluat 2 (siehe S. 17) wurden silyliert und gaschromatographisch aufgetrennt.

20 µg der glucuronierten Steroidreinsubstanzen wurden ohne Durchlauf der üblichen methodischen Aufarbeitung sofort hydrolysiert und dann die hydrolysierten Steroide extrahiert, silyliert und gaschromatographisch aufgetrennt, um einen Vergleich zu den gaschromatographisch wiedergefundenen Steroidmengen der Extrakte in Eluat 1 und Eluat 2 zu erhalten. In Abbildung 7 und 8 sind die Ergebnisse festgehalten. Abbildung 7 zeigt die Versuchsergebnisse mit Androsteronglucuronid. Die Kurve I der Abbildung 7 entspricht 10 µg Androsteronglucuronid, nach β -Hydrolyse, ohne Extraktion, gaschromatographisch aufgezeichnet.

Die Kurve III der Abbildung 7 entspricht der Androsteronglucuronidmenge, die von den zugesetzten 180 µg im wässrigen Durchlauf 1 erscheint und nach 24 Stunden Hydrolyse als freies Androsteron aus dem Hydrolyseansatz zur Gaschromatographie gewonnen wird. Davon wurden 5/100 gaschromatographisch aufgetrennt, vom Gesamtextrakt des wässrigen Durchlaufs 1 nach Hydrolyse und Extraktion demnach 5 %. Die Kurve II der Abbildung 7 entspricht der Androsteronglucuronidmenge, die an die 1. Florisilsäule adsorbiert wurde, also nicht im wässrigen

Durchlauf 1 erschien. Nach Hydrolyse von Androsteronglucuronid im äthanolischen Eluat der 1. Florisilsäule (= Eluat 1) und weiterer Extraktion des hydrolysierten Steroids wurden 10/20, also 50 % des Extraktes von Eluat 1 auf die Gaschromatographiesäule gespritzt. Ein Vergleich der Peakhöhen in Kurve II und III der Abb. 7 zeigt unter Berücksichtigung der eingespritzten Menge (II = 50 %, III = 5 %), daß annähernd 100 % der anfangs zugesetzten Androsteronglucuronidmenge im wässrigen Durchlauf 1 erscheinen. Weiter ist zu erkennen, daß die Androsteronmenge, die nach Hydrolyse von Durchlauf 1 in Eluat 2 wiedergefunden wurde, der Menge entspricht, die nach Hydrolyse, Extraktion und Gaschromatographie von 10 µg Androsteronglucuronid zu erhalten ist (siehe Kurve I und III der Abbildung 7). Auch das Adsorptionsverhalten von Ätiocholanolonglucuronid wurde geprüft (siehe Abb. 8). Wenn man berücksichtigt, daß nur 5 % von Eluat 2 gaschromatographisch aufgetrennt wurden (Kurve III), ergibt sich, daß etwa 98 % des eingesetzten Ätiocholanolonglucuronids im wässrigen Durchlauf 1 erschienen sind.

Zur Testung des Adsorptionsverhaltens von Testosteronglucuronid wurden 27 ng (1,2-³H)-Testosteronglucuronid (ca. 1 Mill. Impulse/min.) in 20 ml Aqua dest. gelöst und auf eine Florisilsäule gegeben. 3 ng (1,2-³H)-Testosteronglucuronid wurden zum Vergleich sofort hydrolysiert und davon 10/20 gaschromatographisch aufgetrennt (siehe Abb. 9, Kurve I).

Bei Vergleich der wiedergefundenen ³H-Aktivitätsmengen in Eluat 1 (Abb. 9, Kurve II) und in Eluat 2 (Abb. 9, Kurve III) zeigt sich, daß etwa 22 % des getesteten ³H-Testosteronglucuronids an die 1. Florisilsäule adsorbiert werden und im äthanolischen Eluat dieser Florisilsäule (= Eluat 1) erscheinen. Nur 78 % des ³H-Testosteronglucuronids fanden sich als wasserlösliches Steroidkonjugat im wässrigen Durchlauf 1. Durch radioaktive Messung der jeweils während der Versuchsschritte entnommenen aliquoten Anteile wurden die Ergebnisse über das Adsorptionsverhalten von ³H-Testosteronglucuronid bestätigt. Es fanden sich 18 % des eingesetzten ³H-

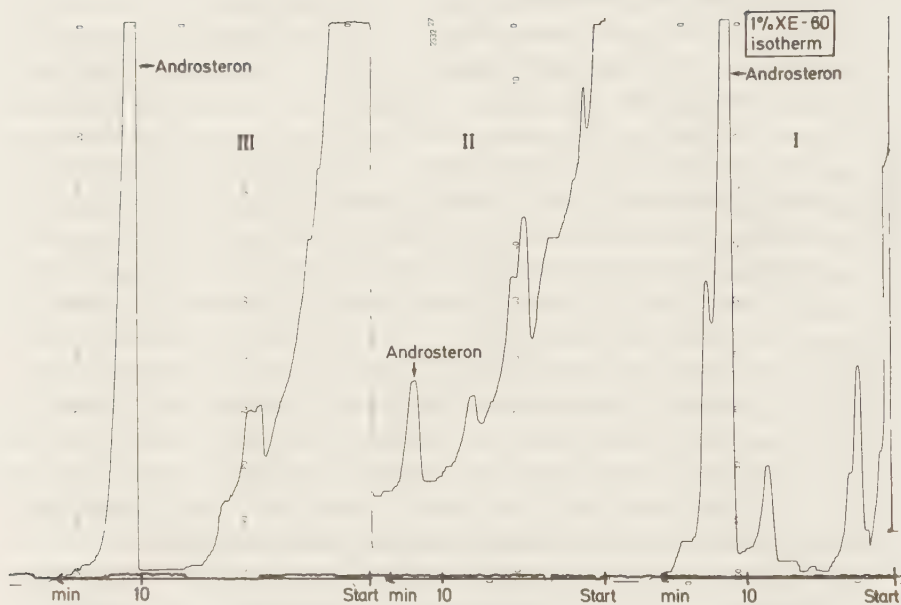


Abb.7: Verhalten von $5\alpha,3\alpha$ -Androsteronglucuronid bei der Adsorptionsextraktion an Florisil

I: Gaschromatographie von $10\mu\text{g}$ Androsteronglucuronid nach β -Hydrolyse.

II/III: Adsorption von $180\mu\text{g}$ Androsteronglucuronid an Florisil

II: Gaschromatographie von 50 % von Eluat 1

III: Gaschromatographie von 5 % von Eluat 2

(Näheres siehe Text Seite 28)

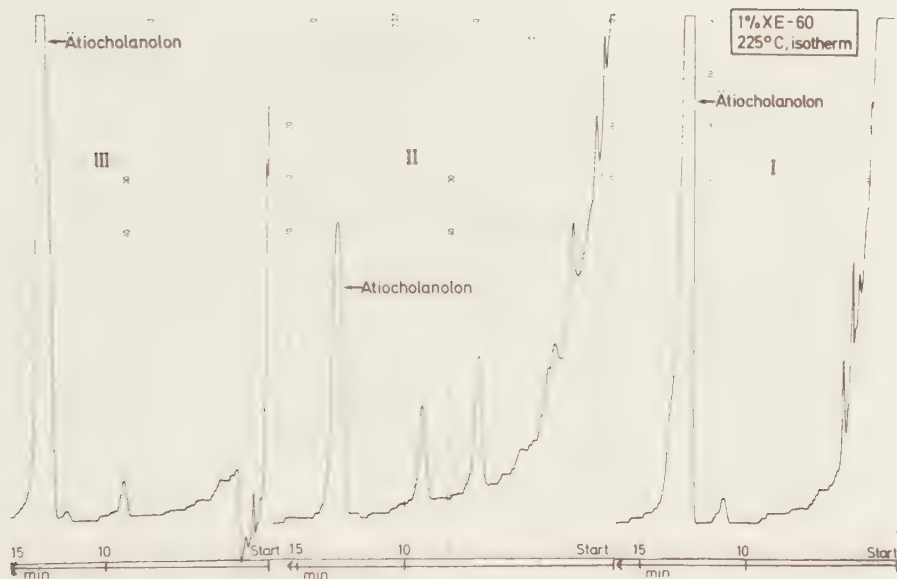


Abb.8: Verhalten von Ätiocholanolonglucuronid bei der Adsorptionsextraktion an Florisil

I. Gaschromatographie von 10 µg Ätiocholanolon-glucuronid nach β -Hydrolyse.

II/III: Adsorption von 180 µg Ätiocholanolon-glucuronid an Florisil

II: Gaschromatographie von 50 % von Eluat 1

III: Gaschromatographie von 5 % von Eluat 2

(Näheres siehe Text Seite 29)

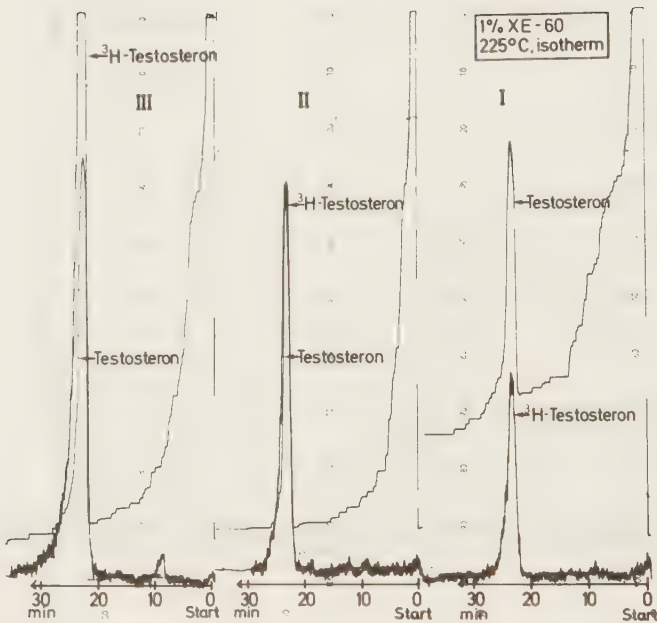


Abb.9: Verhalten von (1,2- ^3H)-Testosteronglucuronid bei der Adsorptionsextraktion an Florisil

I: Radiogaschromatographie von 1,5 ng ^3H -Testosteronglucuronid nach β -Hydrolyse

II/III: Adsorption von 3,0 ng ^3H -Testosteronglucuronid an Florisil

II: Radiogaschromatographie von 20 % von Eluat 1

III: Radiogaschromatographie von 20 % von Eluat 2
(Näheres siehe Text Seite 29)

Testosteronglucuronids im äthanolischen Eluat nach der 1. Florisilsäule, 82 % im wässrigen Durchlauf 1.

Das unterschiedliche Adsorptionsverhalten von Testosteronglucuronid und von Androsteron- bzw. Ätiocholanolonglucuronid an Florisil könnte auf einer unterschiedlichen Hydrophilität der Steroidkonjugate beruhen; denn Testosteronglucuronid ist unpolarer als Androsteron- oder Ätiocholanolonglucuronid und zeigt eine etwas größere Affinität zu Florisil als Androsteron- oder Ätiocholanolonglucuronid.

Die Versuche zur Adsorptionsextraktion von Testosteronglucuronid haben somit ergeben, daß Testosteronglucuronid nur zu etwa 80 % in Eluat 2 erscheint. Das bedeutet, daß die errechneten Werte für die Bildung von Testosteronglucuronid nach Inkubation von Lebergewebe mit ^3H -Testosteron um etwa 20 % zu niedrig liegen dürften. Diese 20 % von Testosteronglucuronid, die in Eluat 1 erscheinen, sind jedoch nach Silylierung in Iso-Octan unlöslich, erscheinen also nicht nach der Gaschromatographie von Eluat 1 und verfälschen nicht die errechnete Menge von freiem Testosteron.

Recovery-Versuche ergaben, daß 1.3 - 96.3 % der den Inkubationsversuchen mit Lebergewebe zugesetzten Aktivität von ^3H -Testosteron im wässrigen Durchlauf 1 erscheinen (siehe Abb. 10). Nach 24 h Hydrolyse mit β -Glucuronidase konnte die ^3H -Aktivität dann weitgehend an Florisil adsorbiert werden; nur 0.5 - 3.3 % der anfangs zugesetzten Aktivität erschienen im wässrigen Durchlauf nach der 2. Florisilsäule (= wässrige Phase 2). Das bedeutet, daß unter den gegebenen Inkubationsbedingungen nur geringe Mengen wasserlöslicher Steroidsulfate entstehen oder daß die β -Glucuronidase-Hydrolyse nicht ganz vollständig ist und noch geringe Mengen von Steroidglucuroniden im wässrigen Medium nach Hydrolyse zurückbleiben. Ein Verlust von ^3H -Aktivität trat außerdem bei der Elution selbst auf. Die Elution der markierten freien bzw. glucuro-

RECOVERY - VERSUCHE

INKUBATION	Inkubation			
	ohne Leber		mit Leber	
	I	II	I	II
	100	100	100	100 %

ADSORPTIONSEXTRAKTION:

wässrige Phase 1	0,20	0,70	1,30	96,3 %
äthanol. Eluat 1	96,80	98,30	89,80	1,7 %
wässrige Phase 2			0,50	3,3 %
äthanol. Eluat 2			1,40	93,9 %

GASCHROMATOGRAPHIE

(1% XE-60)

Kondensation	68,3	76,0	55,5	59,5 %
Detektor	13,5	15,0	11,3	11,4 %
Gesamt recovery	81,8	91,0	66,8	70,9 %

Abb.10: Wiederfindung von ^3H -Aktivität nach Inkubation von Lebergewebe mit $1,4 \times 10^{-10}$ Mol (1,2- ^3H)-Testosteron (I: niedrige Glucuronierung, II: hohe Glucuronierung).
Zum Vergleich zwei Kontrollansätze.

nierten Steroide von der Florisil- bzw. Aluminiumoxydsäule war nicht ganz vollständig. Bei 4 Wiederfindungsexperimenten - 2 Ansätze mit Leberstanzzyllindern und 2 Kontrollansätze - konnten nur 89 - 98 % der ursprünglich zugegebenen Aktivität von ^3H -Testosteron eluiert werden (siehe Abb. 10).

Die nach der Inkubation dem Inkubat zugesetzten, nicht radioaktiv markierten Steroide wurden aus dem wässrigen Inkubat bzw. Hydrolyseansatz weitgehend extrahiert und mit Äthanol fast vollständig und insbesondere in gleicher Relation zueinander eluiert, wie die Gaschromatographie aller Gewebs- und Kontrollansätze zeigten. Es bestand also kein Unterschied in der Elutionsfähigkeit zwischen den polaren Androstadiolen und dem relativ unpolaren Δ^4 -Androstendion (siehe Abb. 11). Aus dem Verhalten der radioaktiv markierten Steroide und der unmarkierten Verbindungen kann man folgern, daß ^3H -Testosteron und die bei der Inkubation entstandenen Metaboliten weitgehend und in gleicher Relation aus dem Inkubationsmedium und auch Hydrolyseansatz fast zu 100 % mit Florisil extrahiert und von diesem zu 90 % eluiert werden können.

e) β -Glucuronidase-Hydrolyse

Zur Beurteilung der Effektivität der β -Glucuronidase-Hydrolyse von glucuronisiertem Testosteron und Testosteronmetaboliten wurden Versuche mit Leberstanzzyllindern und Lebergewebsschnitten herangezogen.

Nimmt man die im wässrigen Durchlauf der 1. Florisilsäule (Durchlauf 1) gemessene Radioaktivität mit 100 % an und errechnet nach Hydrolyse des wässrigen Durchlaufs 1 die prozentuale Wiederfindung der Aktivität im äthanolischen Eluat der hydrolysierten Steroide (= Eluat 2) sowie im wässrigen Durchlauf der 2. Florisilsäule (= Durchlauf 2), so ergaben sich folgende Werte:

1.1 - 14.7 % der im wässrigen Durchlauf 1 gemessenen Aktivi-

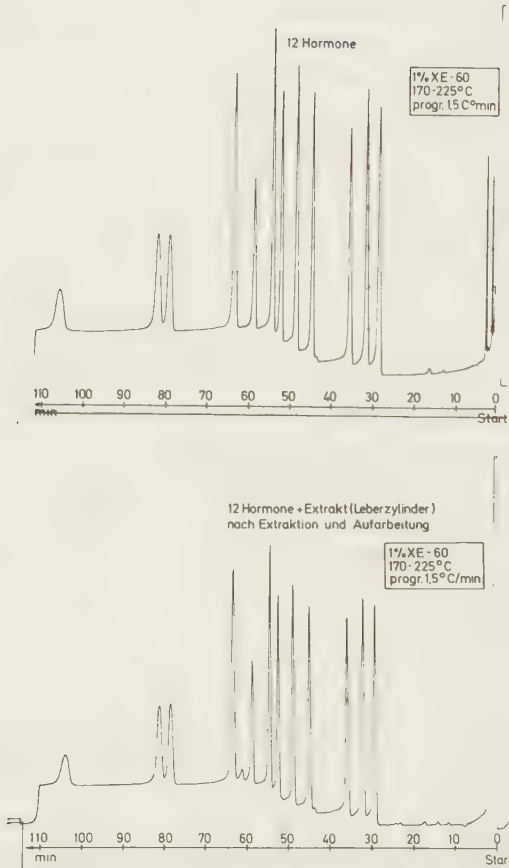


Abb.11: Wiederfindung der nicht radioaktiv markierten Androgene am Flammenionisationsdetektor nach alleiniger Gaschromatographie (oberer Teil der Abbildung) bzw. nach Zugabe zum Inkubationsmedium und nach Extraktion und anschließender Aufarbeitung und Gaschromatographie des Extraktes (unterer Teil der Abbildung)

tät von ^3H -Testosteron fanden sich im wässrigen Durchlauf 2 nach Extraktion der hydrolysierten Steroide wieder. 85.3 - 98.9 % der Aktivität im wässrigen Durchlauf 1 wurden im äthanolischen Eluat der hydrolysierten Steroide nach vorheriger Adsorption an eine 2. Florisilsäule (= Eluat 2) wiedergefunden.

Auf Grund dieser Befunde kann man auf eine weitgehende Hydrolysierbarkeit der im wässrigen Durchlauf 1 erscheinenden Steroidkonjugate schließen. Ferner darf man annehmen, daß es sich bei den hydrolysierbaren Steroidkonjugaten um Steroidglucuronide handelte. Unter den gegebenen Inkubationsbedingungen eventuell gebildete Steroidsulfate sind mit β -Glucuronidase nicht hydrolysierbar und erschienen im wässrigen Durchlauf 2. In die im wässrigen Durchlauf 2 erschienene Menge von ^3H -Aktivität fallen auch Steroidglucuronide, die nicht hydrolysiert wurden.

f) Gaschromatographische Trennung der Steroide

Zahlreiche frühere Untersuchungen zeigten, daß sich die Gaschromatographie zur Trennung von androgenen Hormonen (C-19-Steroide) im Gegensatz zur Papierchromatographie hervorragend bewährt hat (HORNING et al., 1968; PIERCE et al., 1968; CHAMBAZ et al., 1968). Insbesondere Trimethylsilylilätherverbindungen von Androgenen lassen sich noch besser trennen als die nicht silylierten Steroide.

Unter den gegebenen Arbeitsbedingungen der Gaschromatographie lassen sich folgende Androgene gut voneinander separieren: 5α -Androstan- 3α , 17β -diol von 5β -Androstan- 3α , 17β -diol und 5α -Androstan- 3β , 17β -diol, sowie 5α -Androstan- 3α -ol- 17 -on von 5β -Androstan- 3α -ol- 17 -on und 5α -Androstan- 3β -ol- 17 -on, Epitestosteron, Testosteron und Δ^4 -Androstendion.

Fast vollständig trennbar sind 5α -Androstan- 3β -dion und 5β -Androstan- 3 , 17 -dion, sowie 5α -Dihydrotestosteron und 5β -Dihydrotestosteron.

Nur 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol konnte von 5 β -Androstan-3 β ,17 β -diol ebensowenig getrennt werden wie Androsteron von 5 β ,3 β -Androsteron und Androst-4,16-dien-3-on.

Hydroxylierte Verbindungen von Testosteron, wie sie in der Literatur als Metaboliten von Testosteron beschrieben wurden, wurden als Leitsubstanzen bei unseren Versuchen nicht zugesetzt; ihre relativen Retentionszeiten wurden in früheren Untersuchungen bestimmt (ENGELHARDT et al., 1973). 6 β -Hydroxyandrostendion erscheint kurz vor Δ^4 -Androstendion, 16 α -Androstendion kurz danach. 6 β -Hydroxytestosteron hat eine etwas kürzere Retentionszeit als Testosteron, es erscheint in der Fraktion zwischen Epitestosteron und Testosteron. 16 α -Hydroxytestosteron erscheint kurz nach 5 α -Androstandion und wurde als Zwischenzone fraktioniert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in den Zonen von 5 α , 3 α -Androstandiol (Zone 2), 5 β ,3 α -Androstandiol (Zone 3), 5 α , 3 β -Androstandiol (5), 5 β ,3 α -Androsteron (9), 5 α -Dihydrotestosteron (12), 11 β -Hydroxy-5 α ,3 α -Androsteron (13), Epitestosteron (14), 6 β -Hydroxy-Testosteron (15), Testosteron (16), 5 β -Androstandion (18), 5 α -Androstandion (19), 16 α -Hydroxy-Testosteron (20), 16 β -Hydroxy-Testosteron (21), 6 β -Hydroxy- Δ^4 -Androstendion (22), Δ^4 -Androstendion (23) und 16 α -Hydroxy- Δ^4 -Androstendion (24) jeweils nur die genannte Verbindung erscheint oder mit Steroiden konkurriert, die bisher als hepatogene Metaboliten von Testosteron beim Menschen nicht nachgewiesen wurden.

g) Beständigkeit der verwendeten radioaktiv markierten Steroide gegenüber Inkubation, Extraktion, Silylierung und Gaschromatographie als TMS-Äther

Um die Frage zu erklären, ob die eingesetzten Androgene 1,2-³H-Testosteron und 4-¹⁴C-Testosteron gegenüber den einzelnen

Arbeitsgängen (z.B. Inkubation, Extraktion, Silylierung und Gaschromatographie) beständig waren, wurde die radioaktive Wiederfindung der Verbindung 1,2-³H-Testosteron nach Silylierung und Gaschromatographie als Reinsubstanz und nach 2-stündiger Inkubation ohne Lebergewebe mit anschließender Extraktion, Silylierung und Gaschromatographie verglichen. Eine Silylierung und Gaschromatographie der Reinsubstanz 1,2-³H-Testosteron wurde in 2 Versuchen durchgeführt. Ähnliche Untersuchungen über die Beständigkeit von 4-¹⁴C-Testosteron und 1,2-³H-Androstendion gegenüber Inkubation, Extraktion, Silylierung und Gaschromatographie wurden bereits früher durchgeführt (UNTERBURGER, 1973). In Tabelle 1 ist die Verteilung der Radioaktivität für 1,2-³H-Testosteron wiedergegeben.

Es zeigte sich in Übereinklang zu früheren Untersuchungen, daß die 2-stündige Inkubation und die anschließende Aufarbeitung keinen Einfluß auf die Wiederfindung von ³H-Testosteron nach der Gaschromatographie hatte. 82.5 ± 7.1 % der gesamten Radioaktivität waren nach Silylierung und Gaschromatographie von 1,2-³H-Testosteron als Reinsubstanz in der Testosteronfraktion lokalisiert. Bei den Kontrollansätzen ohne Gewebe (n = 24) war die Verteilung der Radioaktivität ähnlich. In der Testosteronfraktion waren bei den Kontrollansätzen noch 86.0 ± 5.6 % der Gesamtaktivität vorhanden. Diese Untersuchungen zeigten also, daß während einer 2-stündigen Inkubation kein Stoffwechsel von Testosteron unter den gewählten Inkubationsbedingungen stattfindet und daß die weitere Aufarbeitung zu keiner Destruktion der erwähnten Verbindung führt. Eine vollständige Konzentrierung der Radioaktivität der Reinsubstanz von 1,2-³H-Testosteron in der entsprechenden Fraktion ist offenbar nicht möglich. Zur Erklärung dieses Befundes können die Untersuchungen von CHAMBAZ et al. (1968) herangezogen werden. Diese Autoren haben in ausführlichen Versuchen gezeigt, daß bei der Gaschromatographie von TMS-Derivaten von Testosteron konstante, separate Massenpeaks auf-

Fraktion	Reinsubstanzen (n=2)				Kontrollansätze (n=24)		
Vorzone	1	0.7	±	0.3 %	0.3	±	0.0 %
5α,3α-Adiol	2	0.1	±	0.0 %	0.1	±	0.0 %
5β,3α-Adiol	3	0.0	±	0.0 %	0.0	±	0.0 %
Zwischenzone	4	0.6	±	0.2 %	0.0	±	0.0 %
5α,3β-Adiol	5	0.3	±	0.0 %	0.0	±	0.0 %
Zwischenzone	6	0.5	±	0.3 %	0.3	±	0.3 %
5α,3α-A	7	1.8	±	1.4 %	0.8	±	0.7 %
Zwischenzone	8	0.1	±	0.0 %	0.1	±	0.0 %
5β,3α-A	9	0.7	±	0.6 %	0.2	±	0.1 %
Zwischenzone	10	0.2	±	0.0 %	0.0	±	0.0 %
5β-DHT	11	0.6	±	0.4 %	0.2	±	0.2 %
5α-DHT	12	0.9	±	0.5 %	0.5	±	0.3 %
Zwischenzone	13	0.3	±	0.0 %	0.4	±	0.2 %
e-T	14	1.8	±	1.1 %	1.1	±	1.0 %
Zwischenzone	15	1.7	±	0.5 %	1.6	±	0.8 %
Testosteron	16	82.5	±	7.1 %	86.0	±	5.6 %
Zwischenzone	17	2.0	±	1.7 %	3.6	±	2.7 %
5β-Adion	18	0.8	±	0.3 %	0.8	±	1.0 %
5α-Adion	19	0.6	±	0.5 %	0.8	±	0.7 %
Zwischenzone	20-22	2.2	±	0.7 %	2.1	±	0.8 %
Δ ⁴ -Androstendion	23	1.3	±	0.6 %	0.8	±	0.5 %
Nachzone	24	0.1	±	0.0 %	0.3	±	0.0 %

Tabelle 1: Verteilung der Radioaktivität nach Silylierung und Gaschromatographie von 1,2-³H-Testosteron als Reinsubstanz (n=2) und nach Inkubation dieser Verbindung ohne Lebergewebe (Kontrollansätze, n = 24)

treten, die sich in ihrer Retentionszeit zum Teil erheblich von Testosteron unterscheiden. Diese zusätzlichen Peaks wurden mittels Massenspektrographie als Enoläther bzw. als Di-TMS-Derivate von Testosteron identifiziert. Außerdem dürfte ein geringer Teil des Testosterons (ca. 2 %) unsilyliert bleiben und es hat damit eine erheblich längere Retentionszeit als Testosteron-TMS (Zone 21, Tabelle 1, Seite 40).

h) Bestimmung der Verluste bei der Aufarbeitung der Lebergewebsextrakte

Um die Verluste von 1,2- ^3H -Testosteron und dessen Metaboliten während der Aufarbeitung zu bestimmen, wurde jeweils nach den einzelnen Arbeitsschritten ein aliquoter Anteil den Proben entnommen und darin die ^3H -Aktivität gemessen (siehe die Abb. 2 und 10). In Abbildung 10 sind die Ergebnisse von 2 Inkubationen mit Lebergewebe und 2 Kontrollansätzen wiedergegeben. Es zeigte sich, daß bis zur Gaschromatographie die Aktivitätsverluste während der einzelnen Schritte der Extraktion und der Reinigung des Extraktes gering sind. Im wässrigen Durchlauf 1 der Florisilsäule bei der Extraktion der Kontrollansätze waren erwartungsgemäß nur geringe Mengen an ^3H -Aktivität wiederzufinden, nämlich 0.2 - 0.7 % der zum Zeitpunkt der Inkubation zugesetzten Gesamtaktivität. Jedoch erschienen bei der Extraktion der Lebergewebsansätze im wässrigen Durchlauf 1 der Florisilsäule 1.3 - 96.3 % der dem Inkubationsmedium zugesetzten Aktivität. Für alle 4 Versuchsansätze wurden die Inkubationsbedingungen konstant gehalten. Daraus läßt sich schließen, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen so gut wie keine Glucuronierung von Testosteron und dessen Metaboliten in den Kontrollansätzen stattfand, dagegen bei den Lebergewebsansätzen eine verschieden hohe Glucuronierung von Testosteron erzielt wurde.

Bei der Extraktion und Nachreinigung der freien bzw. hydrolysierten Steroide kam es zu einem Verlust von 1.7 - 10.2 %

an ^3H -Aktivität. Ein wesentlich größerer Verlust an Aktivität trat bei der Gasfraktionierung und Gaskondensierung am Gasfraktionskollektor auf. An den Watteröhrchen des Gasfraktionskollektors waren 55.5 - 76.0 % der Gesamtradioaktivität nachzuweisen. Berücksichtigt man, daß durch Teilung des Trägergases nach der Gaschromatographie 1/6 der Aktivität dem Flammenionisationsdetektor zugeführt wird und zur Gaskondensation nicht zur Verfügung steht, so betrug die Gesamtwiederfindung nach der Gaschromatographie immerhin noch 66.8 - 91.0 %. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Verluste ist die, daß die gasförmigen Steroide nicht vollständig an die Watte in den Glasröhrchen kondensiert werden. Die Gesamtwiederfindung von 67 - 91 % kann trotzdem als ausreichend bezeichnet werden. Der Gesamtverlust bei der Aufarbeitung und Gaschromatographie der 4 Versuchsansätze lag also bei 9 - 33 % der Gesamtaktivität.

IV. Ergebnisse der Versuche mit Lebergewebe

1. Inkubation von (4-¹⁴C)-Testosteron und (1,2-³H)-Testosteron mit Leberschnitten des Menschen

a) Versuche ohne Zusatz von Cofermenten

8 Ansätze mit jeweils 100 mg Leberschnitten von 2 Patientinnen wurden mit 1.4×10^{-10} Mol (1,2-³H)-Testosteron oder 1.7×10^{-9} Mol (4-¹⁴C)-Testosteron in 3.0 ml Puffer ohne Zusatz von Cofermenten (Inkubationslösungen 1,2 und 3, s.S. 11) inkubiert. 12 - 36 % der nach der Gaschromatographie wiedergefundenen Gesamtaktivität waren im Bereich der Zone von Testosteron in der Fraktion der freien Steroide nachzuweisen. 64 - 88 % des zugesetzten (1,2-³H)-Testosterons bzw. (4-¹⁴C)-Testosterons waren somit durch die Gewebeschnitte abgebaut worden, und zwar 52 - 75 % zu freien und 5 - 16 % zu glucuronierten Metaboliten. In den Versuchen mit Lebergewebsschnitten ohne Cofermentzusatz war in der Fraktion der freien Steroide in folgenden Zonen Aktivität nachzuweisen: In der Zone von Δ^4 -Androstendion 13 - 44 %. 2.8 - 14.7 % der Aktivität waren in der Zone von 5 β ,3 α -Androsteron (= Ätiocholanolon) wiederzufinden. In den Zonen von 5 α - und 5 β -Dihydrotestosteron, 5 α ,3 α -, 5 α ,3 β - und 5 β ,3 α -Androstandiol und in den Zonen von 5 α - und 5 β -Androstandion und 5 α ,3 α -Androsteron waren nur geringe Aktivitätsmengen (0.2-8.6 %) vorhanden, ebenso in Zonen von hydroxylierten Verbindungen. Die in der Fraktion der glucuronierten Steroide gemessene Aktivität (5 - 16 %) war annähernd gleichmäßig auf alle Zonen verstreut. Man kann also unter den gegebenen Inkubationsbedingungen nur einen geringen Abbau von Testosteron zu glucuronierten Steroidmetaboliten nachweisen. Die einzelnen Aktivitätsverteilungen der verschiedenen Ansätze sind in den Tabellen 2 und 3 wiedergegeben.

Fraktion	Patient:	A.E.		A.E.		S.M.		S.M.	
		F	K	F	K	F	K	F	K
	Ansatz	1		2		3		4	
	Zeit(h)	2.0		2.0		2.0		2.0	
Vorzone		0.4	0.2	0.6	0.5	0.0	0.0	0.0	0.1
5 α ,3 α -Adiol		0.8	0.1	1.9	0.7	0.3	0.4	0.3	0.4
5 β ,3 α -Adiol		3.4	0.3	4.2	1.1	0.6	1.2	0.6	1.3
Zwischenzone		0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
5 α ,3 β -Adiol		0.4	0.1	8.6	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1
Zwischenzone		0.3	0.1	0.5	0.2	0.0	0.2	0.0	0.1
5 α ,3 α -A		4.7	0.3	7.8	0.5	3.2	0.3	2.5	0.9
Zwischenzone		0.1	0.0	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1
5 β ,3 α -A		<u>14.7</u>	0.8	<u>14.0</u>	0.9	<u>7.1</u>	1.7	<u>5.5</u>	3.1
5 α ,3 β -A		0.3	0.2	0.4	0.1	1.1	0.1	0.3	0.2
5 β -DHT		3.5	0.1	4.0	0.3	4.8	0.5	5.3	1.1
5 α -DHT		1.6	0.2	1.9	0.3	3.3	0.5	1.4	0.6
Zwischenzone		0.5	0.2	3.2	0.1	1.9	0.7	1.7	0.5
e-T		1.6	0.1	0.9	0.2	1.4	0.5	1.4	0.8
6 β -OH-T		0.0	0.1	0.9	0.2	3.9	0.2	1.9	0.2
T		<u>36.1</u>	0.4	<u>21.0</u>	0.6	<u>17.7</u>	0.3	<u>35.1</u>	2.3
Zwischenzone		0.5	0.2	2.0	0.1	1.4	0.0	1.9	0.3
5 β -Adion		0.9	0.1	0.6	0.7	1.4	0.0	0.5	0.1
5 α -Adion		4.5	0.6	0.3	2.2	3.0	0.1	2.5	0.2
16 α -OH-T		3.0	0.1	0.6	0.1	0.4	0.2	0.0	0.3
Zwischenzone		0.9	0.1	0.3	0.1	5.0	0.0	0.8	0.2
6 β -OH- Δ^4 -A		0.7	0.5	1.2	0.1	5.6	0.0	1.6	0.2
Δ^4 -A		<u>12.8</u>	0.1	<u>14.0</u>	0.6	<u>27.3</u>	0.1	<u>20.8</u>	0.1
16 α -OH- Δ^4 -A		3.3	0.1	0.9	0.1	3.1	0.0	1.6	0.1
SUMME		94.9	5.1	90.0	10.0	93.0	7.0	86.7	13.3

Tabelle 2: Verteilung der ^{14}C -Aktivität bzw. ^3H -Aktivität nach Inkubation von Leberschnitten mit (4- ^{14}C)-Testosteron (Pat. S.M.) bzw. (1,2- ^3H)-Testosteron (Pat. A.E.) in Inkubationslösung 1 ohne Zusatz von Cofermenten. Näheres siehe Text!

F = Fraktion der freien Steroide

K = Fraktion der mit Glucuronsäure konjugierten Steroide

Fraktion	Patient:		S.M.		S.M.		S.M.		S.M.	
	F	K	F	K	F	K	F	K	F	K
	Ansatz		6		7		8			
	Zeit(h)		2.0		2.0		2.0		2.1	
Vorzone	1.5	0.1	0.1	0.2	1.7	0.1	0.3	0.0		
5 α ,3 α -Adiol	1.3	0.3	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2	0.1		
5 β ,3 α -Adiol	1.1	1.1	0.5	1.7	0.5	1.5	0.3	0.6		
Zwischenzone	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0		
5 α ,3 β -Adiol	0.6	0.1	0.3	0.1	0.5	0.1	0.2	0.1		
Zwischenzone	0.6	0.1	0.1	0.1	0.6	0.3	0.0	0.1		
5 α ,3 α -A	2.6	0.4	3.0	0.7	2.5	0.6	1.0	0.3		
Zwischenzone	0.3	0.1	0.5	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0		
5 β ,3 α -A	<u>6.9</u>	1.7	<u>5.7</u>	3.5	<u>5.3</u>	2.8	<u>2.8</u>	1.3		
5 α ,3 β -A	0.0	0.1	0.4	0.2	1.0	0.1	0.1	0.0		
5 β -DHT	5.0	0.6	3.8	0.8	4.5	1.5	2.4	0.8		
5 α -DHT	1.7	0.4	3.0	0.6	2.6	1.3	0.6	0.5		
Zwischenzone	2.5	0.5	1.5	0.8	2.8	1.1	0.9	0.4		
e-T	2.0	0.4	3.7	0.8	1.7	1.9	0.8	0.5		
6 β -OH-T	4.3	0.1	1.9	0.1	3.8	0.0	1.6	0.2		
T	<u>17.1</u>	0.9	<u>11.6</u>	1.2	<u>14.5</u>	1.7	<u>20.7</u>	2.8		
Zwischenzone	1.5	0.1	0.5	0.2	1.1	0.2	0.8	0.2		
5 β -Adion	1.8	0.1	1.9	0.1	0.8	0.1	1.0	0.1		
5 α -Adion	3.0	0.1	3.0	0.2	2.5	0.2	2.0	0.2		
16 α -OH-T	1.4	0.1	5.0	0.1	1.2	0.1	0.1	0.2		
Zwischenzone	12.2	0.1	11.0	0.2	6.7	0.1	5.2	0.2		
6 β -OH- Δ^4 -A	1.7	0.1	1.4	0.0	0.0	0.1	3.1	0.2		
Δ^4 -A	<u>20.4</u>	0.3	<u>25.2</u>	0.2	<u>22.7</u>	1.0	<u>43.8</u>	0.2		
16 α -OH- Δ^4 -A	3.0	0.1	2.3	0.0	6.9	0.2	3.0	0.2		
SUMME	92.4	7.6	87.5	12.5	84.5	15.5	90.7	9.3		

Tabelle 3: Verteilung der ^{14}C -Aktivität nach Inkubation von Leberschnitten mit (4- ^{14}C)-Testosteron (Pat. S.M.) in Inkubationslösung 2 (Ansätze 5 und 6) und in Inkubationslösung 3 (Ansätze 7 und 8) ohne Zusatz von Cofermenten (Näheres siehe Text!).

F = Fraktion der freien Steroide

K = Fraktion der mit Glucuronsäure konjugierten Steroide

b) Versuche mit Zusatz von glucuronierenden Cofermenten

Um die Fähigkeit von Leberschnitten zur Bildung glucuronierter Steroide zu untersuchen, inkubierten wir zwei Ansätze mit jeweils 100 mg Leberschnitten einer Patientin mit 1.4×10^{-10} Mol (1,2- ^3H)-Testosteron unter Zugabe glucuronierender Cofermente (ATP, UDP-Glucuronat und UDP-N-acetyl-glucosamin) in 3.0 ml Puffer (Inkubationslösung 6, siehe S. 11).

16 - 32 % der zugesetzten Aktivität von ^3H -Testosteron waren nach der Gaschromatographie in der Fraktion der freien Steroide im Bereich der Zone von Testosteron wiederzufinden.

68 - 84 % des gesamten ^3H -Testosterons waren durch die Leberschnitte wie folgt abgebaut worden:

50 - 59 % zu freien Steroidmetaboliten; davon 34 - 36 % zu Δ^4 -Androstendion. In den Zonen von $5\alpha,3\alpha$ - und $5\beta,3\alpha$ -Androsteron, 5α - und 5β -Dihydrotestosteron, $5\alpha,3\alpha$ - und $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol und in den Zonen von 5α - und 5β -Androstandion waren nur geringe Aktivitätsmengen (0.2 - 1.8 %) vorhanden. In der Fraktion der glucuronierten Steroide gemessene Aktivitätsmengen von 18 - 25 % des zugesetzten ^3H -Testosterons verteilten sich auf folgende Zonen: 4 - 7 % von Testosteron waren zu $5\beta,3\alpha$ -Androstandiolglucuronid und 1.9 - 3.5 % zu Testosteronglucuronid abgebaut worden. Der Rest der Aktivität verteilte sich in 0.5 - 2.8 % auf die Zonen von Androsteron, $5\alpha,3\alpha$ -Androstandiol, Ätiocholanolon und 5α - und 5β -Dihydrotestosteron. Die Inkubationsversuche mit Zugabe von glucuronierenden Cofermenten ergaben somit nur eine gering erhöhte Bildung von glucuronierten Metaboliten aus ^3H -Testosteron verglichen mit den Inkubationsversuchen ohne Zugabe von Cofermenten. Eine Darstellung der Aktivitätsverteilung beider Versuchsansätze ist in Tabelle 4 zu finden.

Fraktion	Patient:	A.E.		A.E.	
		F	K	F	K
	Ansatz	1		2	
	Zeit(h)	2.0		2.0	
Vorzone		0.3	1.0	0.4	0.9
5 γ ,3 α -Adiol		0.2	1.6	0.1	2.8
5 β ,3 α -Adiol		0.2	<u>4.0</u>	0.3	<u>7.3</u>
Zwischenzone		1.0	0.8	0.1	1.1
5 α ,3 β -Adiol		0.2	0.2	0.4	0.6
Zwischenzone		0.3	0.2	0.3	0.6
5 α ,3 $\star$ A		0.7	0.8	0.9	0.5
Zwischenzone		0.3	0.1	0.8	0.2
5 β ,3 α -A		1.6	1.6	1.5	1.4
5 α ,3 $\star$ -A		0.2	0.0	0.2	0.6
5 β -DHT		0.4	1.8	1.3	1.5
5 α -DHT		0.7	0.3	0.6	1.8
Zwischenzone		0.2	0.2	1.6	0.9
e-T		0.8	0.1	0.8	0.4
6 β -OH-T		0.0	0.1	1.4	0.3
T		<u>31.7</u>	<u>3.5</u>	<u>16.0</u>	<u>1.9</u>
Zwischenzone		1.2	0.3	0.6	0.2
5 β -Adion		0.4	0.1	0.9	0.3
5 α -Adion		0.9	0.1	1.8	0.3
16 α -OH-T		1.1	0.1	1.8	0.2
Zwischenzone		1.2	0.2	2.7	0.2
6 β -OH- Δ^4 -A		0.8	0.1	0.8	0.2
Δ^4 -A		<u>34.0</u>	0.1	<u>36.2</u>	0.2
16 α -OH- Δ^4 -A		3.6	1.1	3.5	1.1
Summe		81.9	18.1	74.7	25.3

Tabelle 4: Verteilung der ^3H -Aktivität nach Inkubation von Leberschnitten mit (1,2- ^3H)-Testosteron (Pat.A.E.) in Inkubationslösung 6 und Zusatz von glucuronierenden Cofermenten (Näheres siehe Text!).

F = Fraktion der freien Steroide

K = Fraktion der mit Glucuronsäure konjugierten Steroide

c) Versuche mit Zusatz von glucuronierenden und wasserstoff-
übertragenden Cofermenten

Um den Einfluß wasserstoff- und glucuronsäureübertragender Cofermente auf den Stoffwechsel von Testosteron durch Leberschnitte beurteilen zu können, inkubierten wir Schnitte (je 100 mg: Pat. A.E. und Pat. S.M.) mit 1.4×10^{-10} Mol ($1,2\text{-}^3\text{H}$)-Testosteron oder 1.7×10^{-9} Mol ($4\text{-}^{14}\text{C}$)-Testosteron in 3.0 ml Puffer unter Zusatz folgender Cofermente:

ATP, UDP-N-acetylglucosamin, UDP-glucuronat, NAD, NADH, NADP, Glucose-6-P und Glucose-6-P-dehydrogenase (in KHR-Puffer mit MgCl_2 oder MgSO_4 , Inkubationslösungen 4 und 5, siehe Seite 11). In Vergleich zu den Ansätzen ohne Cofermente oder den Ansätzen mit glucuronsäureübertragenden Cofermenten fand sich bei Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Fermenten weniger Aktivität in der Zone von freiem Testosteron (2 - 6%), d.h. der Abbau von Testosteron wurde durch die Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten gesteigert (94 - 98 %; siehe Tabelle 5 und 6).

Im Gegensatz zu den Ansätzen ohne Cofermente und den Ansätzen nur mit glucuronierenden Cofermenten erfolgte ein verstärkter Abbau zu glucuronierten Steroidmetaboliten (63 - 81 %). Der Abbau von Testosteron zu freien Metaboliten (17 - 35 %) war dagegen entsprechend stark reduziert:

Nur 0.5 - 1.0 % Aktivität des zugesetzten Testosterons waren in der Zone von Δ^4 -Androstendion zu messen. Auch in den Zonen von 5β -Androstandiol, 5β - und 5α -Androsteron, 5β - und 5α -Dihydrotestosteron, 5β - und 5α -Androstandion waren geringe Aktivitätsmengen vorhanden (0.4 - 9.0 %).

Unter den glucuronierten Steroiden waren bevorzugt folgende Metaboliten zu finden: $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol (12-23 %), $5\beta,3\alpha$ -Androsteron (11 - 24 %), $5\alpha,3\alpha$ -Androstandiol (6 - 21 %), 5α -Dihydrotestosteron (1 - 6 %), $5\alpha,3\alpha$ -Androsteron (1 - 5 %) und 5β -Dihydrotestosteron (1 - 3 %).

Patient: A.E.			A.E.		S.M.		S.M.	
Fraktion	F	K	F	K	F	K	F	K
Ansatz	1		2		3		4	
Zeit(h)	2,0		2.0		2.0		2.0	
Vorzone	0.8	1.4	11.0	2.0	0.1	0.3	0.3	0.3
5 α ,3 α -Adiol	0.4	<u>15.3</u>	0.4	<u>20.8</u>	0.1	<u>6.8</u>	0.1	<u>5.8</u>
5 β ,3 α -Adiol	0.8	<u>17.6</u>	1.4	<u>23.4</u>	0.7	<u>13.3</u>	0.5	<u>11.7</u>
Zwischenzone	0.5	0.6	0.2	0.2	0.6	0.5	0.1	0.1
5 α ,3 β -Adiol	1.5	1.5	0.7	0.6	0.7	0.4	0.2	1.3
Zwischenzone	1.1	1.2	0.4	1.0	0.0	2.9	0.4	2.5
5 α ,3 α -A	1.1	1.9	1.3	1.3	1.2	2.5	0.4	3.2
Zwischenzone	0.4	0.7	0.3	0.2	0.1	0.3	1.3	1.6
5 β ,3 α -A	1.5	<u>11.4</u>	2.5	<u>10.6</u>	8.3	<u>14.7</u>	2.5	<u>24.0</u>
5 α ,3 β -A	2.5	1.5	0.4	1.3	0.1	0.3	0.6	0.2
5 β -DHT	1.4	1.3	1.6	1.2	2.0	2.4	0.9	2.7
5 α -DHT	2.9	1.3	1.4	1.1	3.7	6.4	3.5	4.7
Zwischenzone	0.5	0.7	0.3	0.5	2.8	3.5	0.8	8.9
e-T	2.1	2.3	0.7	0.6	1.8	7.5	0.9	8.2
6 β -OH-T	0.9	0.3	0.9	0.5	0.9	0.4	0.2	0.4
T	<u>2.0</u>	5.6	<u>2.1</u>	0.4	<u>2.7</u>	2.5	<u>1.7</u>	2.6
Zwischenzone	<u>1.4</u>	0.8	1.4	0.8	0.7	0.5	0.9	0.1
5 β -Adion	0.7	0.3	0.5	0.1	0.4	0.3	1.3	0.3
5 α -Adion	1.1	0.6	0.9	0.2	2.1	1.0	0.5	0.9
16 α -OH-T	0.5	0.4	0.4	1.1	0.8	0.5	1.6	0.3
Zwischenzone	1.2	0.7	0.5	0.2	0.8	0.2	0.1	0.0
6 β -OH- Δ^4 -A	0.5	1.7	0.3	0.1	0.5	0.2	0.1	0.2
Δ^4 -A	<u>1.0</u>	0.4	<u>1.0</u>	0.2	<u>0.8</u>	0.2	<u>0.5</u>	0.3
16 α -OH- Δ^4 -A	1.3	2.8	0.9	0.1	0.8	0.2	0.0	0.6
SUMME	28.0	<u>72.0</u>	31.5	<u>68.5</u>	32.4	<u>67.6</u>	19.4	<u>80.6</u>

Tabelle 5: Verteilung der ^{14}C -Aktivität bzw. ^3H -Aktivität nach Inkubation von Leberschnitten mit (4- ^{14}C)-Testosteron (Pat. S.M.) bzw. (1,2- ^3H)-Testosteron (Pat. A.E.) in Inkubationslösung 4 und Zusatz von glucuronierenden und wasserstoffübertragenden Cofermenten.

Patient:	S.M.		S.M.	
Fraktion	F	K	F	K
Ansatz	5		6	
Zeit(h)	2.0		2.0	
Vorzone	0.1	0.4	0.0	0.0
5 α ,3 α -Adiol	0.0	<u>5.8</u>	0.1	<u>8.7</u>
5 β ,3 α -Adiol	1.5	<u>12.7</u>	1.0	<u>14.2</u>
Zwischenzone	0.1	0.3	0.2	0.5
5 α ,3 β -Adiol	0.6	0.8	0.4	1.4
Zwischenzone	0.8	2.5	0.3	1.6
5 α ,5 α -A	0.5	2.5	1.1	4.5
Zwischenzone	0.2	0.4	0.5	3.0
5 β ,3 α -A	<u>9.4</u>	<u>15.4</u>	<u>6.4</u>	<u>21.9</u>
5 α ,5 α -A	0.4	0.6	0.4	0.5
5 β -DHT	1.9	2.0	1.3	1.2
5 α -DHT	3.9	3.6	4.2	5.0
Zwischenzone	2.6	4.9	0.2	0.4
e-T	2.6	6.9	3.3	1.2
6 β -OH-T	0.8	0.3	0.0	0.2
T	<u>2.5</u>	1.8	<u>6.3</u>	0.7
Zwischenzone	1.4	0.5	0.3	0.7
5 β -Adion	0.4	0.3	1.3	0.6
5 α -Adion	2.5	0.7	1.7	0.1
16 α -OH-T	0.3	0.3	2.2	0.2
Zwischenzone	0.4	0.1	0.8	0.0
5 β -OH- Δ^4 -A	3.0	0.1	0.3	0.0
Δ^4 -A	<u>0.5</u>	0.2	<u>0.6</u>	0.0
16 α -OH- Δ^4 -A	0.8	0.2	0.6	0.1
SUMME	37.0	<u>63.0</u>	33.2	<u>66.8</u>

Tabelle 6: Verteilung der ^{14}C -Aktivität nach Inkubation von Leberschnitten mit (4- ^{14}C)-Testosteron (Pat.S.M.) in Inkubationslösung 5 und Zusatz von glucuronierenden und wasserstoffübertragenden Cofermenten.

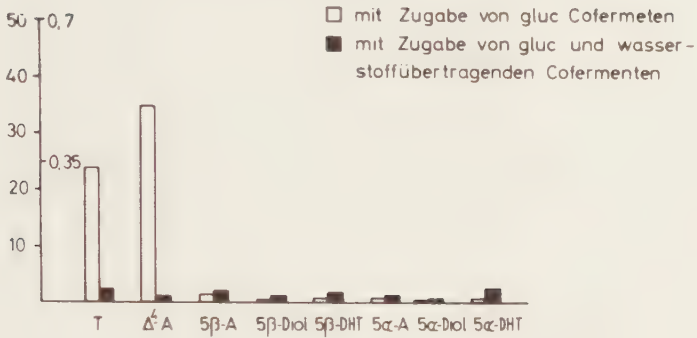
Es wurden also mehr 5β - als 5α -hydrierte Verbindungen gebildet. 0.4 - 5.6 % der Aktivität von zugesetztem Testosteron waren in der Zone von Testosteron in der Fraktion der glucuronierten Steroide zu finden.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß durch Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten ein verstärkter Abbau von ^3H - bzw. ^{14}C -Testosteron zu glucuronierten Steroidmetaboliten stattfand, und zwar bevorzugt zu den $5\beta,3\alpha$ -hydrierten Metaboliten $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol und $5\beta,3\alpha$ -Androsteron. Eine Gegenüberstellung der Ansätze 1 und 2 der Lebergewebsprobe des Pat. A.E. mit Zusatz von glucuronsäureübertragenden Cofermenten (siehe Tabelle 4) und der Ansätze 1 und 2 mit Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten (siehe Tabelle 5) findet sich in Abbildung 12.

Legende zu Abb. 12:

Der Maßstab der Ordinate gibt links den prozentualen Abbau der eingesetzten Aktivität (s.S. 15) und rechts den absoluten Abbau in $[\text{Mol} \times 10^{-10}]$ wieder. Das Gewicht der eingesetzten Lebergewebsschnitte betrug 100 mg Feuchtgewicht.

FREIE METABOLITEN



Glucuronisierte Metaboliten

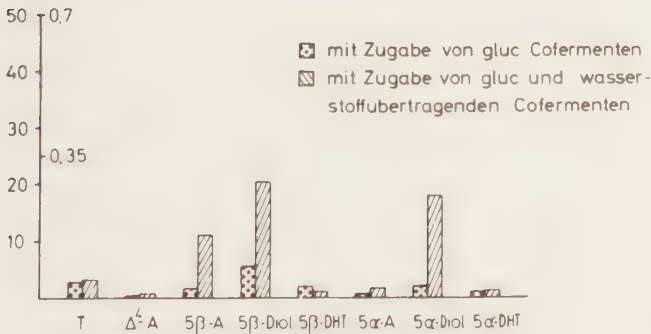


Abb.12: Gegenüberstellung des Stoffwechsels von (1,2-³H)-Testosteron zu freien und glucuronierten Metaboliten in Lebergewebsschnitten (Pat. A.E.) mit Zusatz von glucuronsäureübertragenden Cofermenten und mit Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten. Es sind jeweils die Mittelwerte der Ergebnisse zweier Parallelansätze wiedergegeben.

2. Inkubation von (4-¹⁴C)-Testosteron und (1,2-³H)-Testosteron mit subzellulären Fraktionen menschlicher Leber

a) Inkubationen mit Zytosolfractionen

Zytosolfractionen von Lebergewebe der Patientinnen A.E. und S.M. wurden in 8 Ansätzen mit 1.4×10^{-10} Mol (1,2-³H)-Testosteron oder $1,7 \times 10^{-9}$ Mol (4-¹⁴C)-Testosteron in unterschiedlichen Inkubationslösungen (4,6 und 7, siehe S.11) 0.5 oder 2.0 Stunden inkubiert:

Je 2 Ansätzen einer Zytosolfraction wurden bei einer Inkubation mit ³H-Testosteron die Cofermente ATP,UDP-Glucuronat und UDP-N-acetylglucosamin (= Inkubationslösung 6), bei einer weiteren Inkubation ein NADPH-regenerierendes System zugesetzt (=Inkubationslösung 7). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 7 ersichtlich.

Bei Zugabe des NADPH-regenerierenden Systems zu den Inkubationsansätzen 1 und 2 waren in der Fraktion der freien Steroide nach 2 Stunden 56 - 64 % der ³H-Aktivität im Bereich der Zone von 5 β ,3 α -Androstandiol wiederzufinden, 14 % im Bereich der Zone 5 β ,3 α -Androsteron und 10 - 12 % im Bereich der Zone von 5 β -Dihydrotestosteron. Im Bereich der Zonen von Testosteron, Δ^4 -Androstendion und 5 β -Androstandion waren nur geringe Aktivitätsmengen zu finden (0.1 - 2.0 %).

In der Fraktion der glucuronierten Steroide war dagegen keine Aktivität nachweisbar.

Bei Zusatz von ATP, UDP-Glucuronat und UDP-N-acetylglucosamin zu den Zytosolansätzen 3 und 4 war die Aktivitätsverteilung im Extrakt ähnlich wie bei den Ansätzen mit dem NADPH-regenerierenden System. In der Fraktion der freien Steroide konnten 41 - 46 % der Aktivität in der Zone von 5 β ,3 α -Androstandiol, 17 - 20 % im Bereich der Zone von 5 β -Dihydrotestosteron, 14 - 15 % im Bereich der Zone von 5 β ,3 α -Androsteron und 2.3 - 4.9 % im Bereich der Zone von 5 β -Androstandion ge-

Patient:	A.E.	A.E.	A.E.	A.E.
Fraktion	F	F	F K	F K
Ansatz	1	2	3	4
Zeit(h)	2.0	2.0	2.0	2.0
Vorzone	1.7	1.5	1.7 0.1	0.4 0.1
5 α ,3 α -Adiol	1.6	0.8	0.5 0.0	1.9 0.0
5 β ,3 α -Adiol	<u>55.8</u>	<u>64.4</u>	<u>46.3</u> <u>2.1</u>	<u>41.4</u> <u>3.3</u>
Zwischenzone	0.8	0.7	0.7 0.1	0.0 0.1
5 α ,3 β -Adiol	1.1	1.5	0.6 0.1	0.6 0.1
Zwischenzone	1.5	0.8	0.9 0.1	0.7 0.1
5 α ,3 α -A	0.7	0.8	0.7 0.0	0.9 0.0
Zwischenzone	3.5	0.6	0.3 0.0	0.6 0.0
5 β ,3 α -A	<u>13.8</u>	<u>13.8</u>	<u>15.1</u> 0.6	<u>14.3</u> 0.6
5 α ,3 β -A	0.9	0.5	0.2 0.0	1.2 0.0
5 β -DHT	<u>11.7</u>	<u>9.8</u>	<u>19.7</u> <u>2.3</u>	<u>16.8</u> <u>2.3</u>
5 α -DHT	0.9	0.9	1.0 0.0	1.0 0.0
Zwischenzone	0.5	0.4	0.3 0.0	0.4 0.0
e-T	0.4	0.3	0.0 0.0	2.1 0.0
6 β -OH-T	0.3	0.1	0.1 0.0	0.2 0.0
T	0.9	0.6	1.9 0.1	2.8 0.1
Zwischenzone	0.7	0.4	0.3 0.0	1.4 0.0
5 β -Adion	2.0	1.0	<u>2.3</u> 0.1	<u>4.9</u> 0.1
5 α -Adion	0.3	0.5	0.7 0.0	0.5 0.0
16 α -OH-T	0.1	0.2	0.2 0.0	0.2 0.0
Zwischenzone	0.2	0.1	0.3 0.0	0.0 0.0
6 β -OH- Δ^4 -A	0.1	0.1	0.0 0.2	0.2 0.2
Δ^4 -A	0.3	0.1	0.3 0.0	0.1 0.0
16 α -OH- Δ^4 -A	0.2	0.1	0.0 0.0	0.3 0.0
SUMME	100.0	100.0	94.0 <u>6.0</u>	92.8 <u>7.2</u>

Tabelle 7: Verteilung der ^3H -Aktivität nach Inkubation von Zytosolfractionen mit (1,2- ^3H)-Testosteron (Pat. A.E.) und Zusatz eines NADPH-regenerierenden Systems (Inkubationslösung 7, Ansätze 1 und 2) bzw. unter Zusatz von glucuronisierenden Cofermenten (Inkubationslösung 6, Ansätze 3 und 4). Näheres siehe Text!

F = Fraktion der freien Steroide

K = Fraktion der mit Glucuronsäure konjugierten

messen werden. Insgesamt waren 6.0 - 7.2 % der Aktivität in der Fraktion der glucuronierten Steroide als $5\beta,3\alpha$ -Androstadiolglucuronid (2.1 - 3.3 %) und 5β -Dihydrotestosteronglucuronid (2.3 %) wiederzufinden.

Weiterhin wurden von den Lebergewebsproben der Patientinnen A.E. und S.M. jeweils 2 Ansätze mit Zytosol und mit ATP, UDP-Glucuronat, UDP-N-acetylglucosamin sowie wasserstoffübertragenden Cofermenten angefertigt. Die Ansätze 5 und 6 der Pat. S.M. wurden mit (4 - ^{14}C)-Testosteron 0.5 Stunden, die Ansätze 7 und 8 der Pat. A.E. 2.0 Stunden mit ($1,2$ - ^3H)-Testosteron in Inkubationslösung 4 (s.S. 11) inkubiert. Die Aktivitätsverteilung dieser Versuche ist in Tabelle 8 wiedergegeben.

In den Extrakten der Zytosolansätze 5 und 6 waren nach 30 Minuten Inkubationszeit 57 - 63 % der zugesetzten ^{14}C -Aktivität in der Fraktion der freien Steroide im Bereich der Zone von $5\alpha,3\alpha$ -Androstadiol wiederzufinden, 17 - 18 % im Bereich der Zone von 5β -Dihydrotestosteron und 7 - 9 % im Bereich der Zone von $5\beta,3\alpha$ -Androsteron (=Ätiocholanolon). Im Bereich der Zonen von Testosteron, Δ^4 -Androstendion und im Bereich von 5α -Androstendion waren nur geringe Aktivitätsmengen (0.1 - 2.0 %). Nur 1.4 - 1.8 % der Ausgangsaktivität konnten in der Fraktion der glucuronierten Steroide gemessen werden und waren annähernd gleichmäßig auf alle Zonen verteilt.

Verglichen mit den Zytosolansätzen 5 und 6 war bei den Ansätzen 7 und 8 nach 2-stündiger Inkubation eine deutliche Anreicherung der zugesetzten ^3H -Aktivität in der Fraktion der glucuronierten Steroide festzustellen (32 - 56 %). Folgende Testosteron-metaboliten waren bevorzugt glucuroniert worden: $5\beta,3\alpha$ -Androstadiol (14 - 21 %) und $5\beta,3\beta$ -Androstadiol bzw. $5\alpha,3\alpha$ -Androstadiol (0.4 - 6 %). In den Zonen von Testosteron, 5β -Dihydrotestosteron und $5\beta,3\alpha$ -Androsteron waren nur geringe Aktivitätsmengen vorhanden (0.5 - 2.0 %).

In der Fraktion der freien Steroide waren nach 2 Stunden 8 - 21 % der ^3H -Aktivität im Bereich der Zone von $5\beta,3\alpha$ -Androstan-

Fraktion	Patient:		S.M.		S.M.		A.E.		A.E.	
			F	K	F	K	F	K	F	K
	Ansatz		5		6		7		8	
	Zeit(h)		0.5		0.5		2.0		2.0	
Vorzone			1.1	0.1	0.5	0.0	2.6	4.6	2.2	1.4
5 α ,3 α -Adiol			0.8	0.1	1.0	0.1	1.4	<u>6.0</u>	1.3	<u>0.4</u>
5 β ,3 α -Adiol			<u>56.9</u>	0.5	<u>62.6</u>	0.6	<u>8.1</u>	<u>21.3</u>	<u>20.9</u>	<u>14.2</u>
Zwischenzone			0.5	0.0	0.4	0.2	0.7	0.3	0.4	0.9
5 α ,3 β -Adiol			0.3	0.1	0.2	0.0	1.1	0.7	1.3	0.5
Zwischenzone			0.9	0.1	0.9	0.0	1.6	1.0	2.9	1.0
5 α ,3 α -A			0.8	0.1	0.6	0.0	1.1	0.3	1.3	0.5
Zwischenzone			0.5	0.1	0.7	0.0	0.3	0.3	1.4	0.9
5 α ,3 α -A			<u>8.6</u>	0.1	<u>6.8</u>	0.1	<u>3.4</u>	1.2	<u>9.4</u>	1.7
5 α ,3 β -A			0.6	0.0	1.2	0.0	0.3	0.2	0.8	0.3
5 β -DHT			<u>18.2</u>	0.1	<u>17.1</u>	0.1	<u>3.2</u>	1.1	<u>3.8</u>	0.5
5 α -DHT			1.2	0.1	1.0	0.0	2.9	0.2	3.5	0.4
Zwischenzone			0.6	0.0	0.4	0.0	1.1	0.5	0.7	0.4
e-T			0.5	0.1	0.4	0.0	1.0	0.4	1.3	0.4
6 β -OH-T			0.4	0.0	0.4	0.0	1.1	2.4	1.3	0.3
T			2.0	0.1	1.2	0.1	3.3	0.5	3.8	2.0
Zwischenzone			1.0	0.1	0.6	0.0	3.4	0.6	1.9	1.3
5 β -Adion			1.5	0.0	1.5	0.0	0.8	0.5	1.3	0.2
5 α -Adion			0.5	0.1	0.4	0.0	1.5	0.2	1.3	0.3
16 α -OH-T			0.2	0.0	0.1	0.0	1.5	0.6	1.1	1.0
Zwischenzone			0.1	0.1	0.1	0.0	2.2	2.3	0.7	0.5
6 α -OH- Δ^4 -A			0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.3	2.5	0.4
Δ^4 -A			0.4	0.1	0.1	0.0	1.1	0.3	2.9	0.4
16 α -OH- Δ^4 -A			0.4	0.1	0.5	0.1	0.3	0.2	0.7	1.7
SUMME			98.2	<u>1.8</u>	98.6	<u>1.4</u>	43.9	<u>56.1</u>	68.4	<u>31.6</u>

Tabelle 8: Verteilung der ^{14}C -Aktivität bzw. ^3H -Aktivität nach Inkubation von Zytosolfractionen mit (4- ^{14}C)-Testosteron (Pat. S.M.) bzw. (1,2- ^3H)-Testosteron (Pat. A.E.) und Zusatz von glucuronierenden und wasserstoffübertragenden Cofermenten (Inkubationslösung 4). Näheres siehe Text!

F = Fraktion der freien Steroide

K = Fraktion der mit Glucuronsäure konjugierten Steroide

diol wiederzufinden, im Bereich der Zonen von $5\beta,3\alpha$ -Androsteron, 5β -Dihydrotestosteron, Δ^4 -Androstendion und 5β -Androstandion dagegen nur 0.8 - 9.4 % der Aktivität.

Betrachtet man die Aktivitätsverteilung der Versuchsansätze 1 - 4 (s. Tabelle 7) und 5 und 6 (s. Tabelle 8), so findet man trotz unterschiedlicher Cofermentzusätze beinahe identische Ergebnisse. Nach 2 Stunden Inkubation der Ansätze 7 und 8 ist ein beträchtlich höherer Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten (32 - 56 %) als nach 0.5-stündiger Inkubation der Ansätze 5 und 6 (1.4 - 1.8 %) festzustellen (siehe Tabelle 8). Eindeutige Unterschiede im Metabolitenmuster der gebildeten freien bzw. glucuronierten Steroide waren nicht nachzuweisen. Der Abbau von Testosteron zu freien und glucuronierten Metaboliten bei den Zytosolversuchen erfolgte fast ausschließlich zu 5β -Verbindungen, dabei bevorzugt zu $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol und $5\beta,3\alpha$ -Androstandiolglucuronid.

b) Inkubationen mit Mikrosomenfraktionen

Mikrosomenfraktionen der Lebergewebsproben von den Pat. A.E. und S.M. wurden in 10 Ansätzen mit 1.4×10^{-10} Mol ($1,2$ - ^3H)-Testosteron oder 1.7×10^{-9} Mol (4 - ^{14}C)-Testosteron in den Inkubationslösungen 4, 5, 6 und 7 (siehe Seite 11) 0.5 oder 2.0 Stunden inkubiert.

Je 2 Ansätze einer Mikrosomenfraktion wurden mit ($1,2$ - ^3H)-Testosteron unter Zugabe von ATP, UDP-N-acetylglucosamin und UDP-Glucuronat in Inkubationslösung 6 (siehe S. 11) oder unter Zugabe eines NADPH-regenerierenden Systems in Inkubationslösung 7 inkubiert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 9 ersichtlich.

Bei Zugabe des NADPH-regenerierenden Systems zu den Inkubationslösungen 1 und 2 waren in der Fraktion der freien Steroide nach 2 Stunden 14 - 21 % der ^3H -Aktivität im Bereich

Fraktion	Patient: A.E.		A.E.		A.E.		A.E.	
	F	F	F	K	F	K	F	K
	Ansatz	1	2	3	4			
	Zeit(h)	2.0	2.0	2.0	2.0			
Vorzone	0.1	0.8	1.3	0.3	0.2	0.6		
5 α ,3 α -Adiol	0.4	0.4	0.2	0.1	0.2	2.8		
5 β ,3 α -Adiol	0.4	0.3	1.8	0.1	2.5	0.3		
Zwischenzone	0.1	0.2	0.1	0.0	0.2	0.2		
5 α ,3 β -Adiol	<u>13.5</u>	<u>20.6</u>	0.2	0.0	0.2	0.1		
Zwischenzone	4.0	2.3	0.3	0.1	0.2	0.2		
5 α ,3 α -A	<u>4.9</u>	<u>6.2</u>	0.5	0.0	0.0	0.0		
Zwischenzone	4.3	3.5	0.3	0.0	0.1	0.2		
5 β ,3 α -A	5.7	9.8	0.1	0.1	0.4	0.1		
5 α ,3 β -A	1.9	2.8	0.1	0.1	0.2	0.1		
5 β -DHT	4.5	8.4	0.0	0.0	0.0	0.3		
5 α -DHT	<u>14.5</u>	<u>13.8</u>	0.0	0.2	6.6	0.4		
Zwischenzone	5.8	1.2	0.4	0.2	0.5	0.2		
e-T	5.9	3.0	0.5	0.2	1.2	0.2		
6 β -OH-T	4.3	4.9	0.8	0.1	0.1	0.4		
T	<u>17.6</u>	<u>17.1</u>	<u>65.9</u>	<u>9.2</u>	<u>47.6</u>	<u>7.2</u>		
Zwischenzone	0.2	1.9	0.0	0.1	0.0	0.4		
5 β -Adion	1.2	0.3	0.0	0.1	0.7	0.0		
5 α -Adion	1.7	0.6	0.0	0.1	0.1	0.1		
16 α -OH-T	1.1	0.3	0.5	0.2	0.9	0.6		
Zwischenzone	1.6	0.7	1.6	0.1	0.5	0.1		
6 β -OH- Δ^4 -A	1.6	0.4	0.7	0.1	4.2	0.1		
Δ^4 -A	0.8	0.2	<u>23.5</u>	0.0	<u>18.5</u>	0.4		
16 α -OH- Δ^4 -A	2.3	0.5	1.4	0.1	0.4	0.0		
SUMME	100.0	100.0	97.3	<u>2.7</u>	85.3	<u>14.7</u>		

Tabelle 9: Verteilung der ^3H -Aktivität nach Inkubation von Mikrosomenfraktionen der Lebergewebsprobe von Pat. A.E. mit (1,2- ^3H)-Testosteron unter Zusatz eines NADPH-regenerierenden Systems (Ansätze 1 und 2) oder glucuronierenden Cofermenten (Ansätze 3 und 4).

Näheres siehe Text!

der Fraktion von $5\alpha,3\beta$ -Androstandiol wiederzufinden, 14 - 15 % im Bereich der Zone von 5α -Dihydrotestosteron, 5 - 6 % im Bereich der Zone von $5\alpha,3\alpha$ -Androsteron und 17 - 18 % im Bereich der Zone von Testosteron. Im Bereich der Zonen von $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol, $5\beta,3\alpha$ -Androsteron, 5β -Dihydrotestosteron und Δ^4 -Androstendion waren nur geringe Aktivitätsmengen nachzuweisen (0.2 - 0.6%). Es waren somit vorwiegend 5α -Verbindungen gebildet worden. Ein Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten war nicht nachzuweisen.

Bei Zugabe von ATP, UDP-Glucuronat und UDP-N-acetylglucosamin zu den Mikrosomenansätzen 3 und 4 fanden sich noch 48 - 66 % der ^3H -Aktivität in der Fraktion der freien Steroide in der Zone von Testosteron. Im Bereich der Zone von Δ^4 -Androstendion konnten 19 - 23 % ^3H -Aktivität gemessen werden, d.h. Testosteron wurde zu Δ^4 -Androstendion abgebaut. 2.7 - 14.7 % des zugesetzten ^3H -Testosterons waren zu glucuronierten Metaboliten abgebaut worden: 0.2 - 7.2 % zu Testosteronglucuronid und 0.1 - 2.8 % zu $5\alpha,3\alpha$ -Androstandiolglucuronid. Doch insgesamt gesehen war der Abbau von Testosteron zu Steroidglucuroniden gering.

Weiterhin wurden von der Lebergewebsprobe der Pat. A.E. 2 und von der Pat. S.M. 4 Ansätze mit Mikrosomen und mit glucuronierenden und wasserstoffübertragenden Cofermenten angefertigt. Die Ansätze 5, 6, 7 und 8 der Pat. S.M. wurden mit ($4\text{-}^{14}\text{C}$)-Testosteron 0.5 Stunden in Inkubationslösung 4 oder 5, die Ansätze 9 und 10 der Pat. A.E. mit ($1,2\text{-}^3\text{H}$)-Testosteron 2.0 Stunden in Inkubationslösung 4 (siehe Seite 41) inkubiert. Die Aktivitätsverteilung dieser Versuche ist in den Tabellen 10 und 11 wiedergegeben.

In den Extrakten der Mikrosomenansätze 5, 6, 7 und 8 waren nach 30 Minuten Inkubationszeit 26 - 33 % der zugesetzten ^{14}C -Aktivität in der Fraktion der freien Steroide im Bereich der Zone

Fraktion	Patient: S.M.		S.M.		S.M.		S.M.	
	F	K	F	K	F	K	F	K
	Ansatz	5	6		7		8	
	Zeit(h)	0.5	0.5		0.5		0.5	
Vorzone		0.1 0.5	0.2 0.1		0.1 0.7		0.0 0.1	
5 α ,3 α -Adiol		1.3 1.5	1.1 0.6		0.8 0.8		1.0 0.4	
5 β ,3 α -Adiol		0.4 0.4	0.1 0.0		0.1 0.1		0.1 0.0	
Zwischenzone		0.1 0.1	0.2 0.0		0.1 0.0		0.1 0.0	
5 α ,3 β -Adiol		<u>9.2</u> 0.4	<u>8.3</u> 0.0		<u>6.2</u> 0.1		<u>6.1</u> 0.0	
Zwischenzone		0.1 0.1	1.4 0.0		0.7 0.2		0.6 0.1	
5 α ,3 α -A		3.7 0.4	2.8 0.0		3.5 0.2		4.2 0.0	
Zwischenzone		0.5 0.1	0.5 0.0		0.4 0.0		0.4 0.0	
5 β ,3 α -A		2.6 0.4	3.1 0.0		3.0 0.1		2.7 0.0	
5 α ,3 β -A		1.9 0.1	1.4 0.0		2.0 0.1		1.3 0.0	
5 β -DHT		<u>10.1</u> 0.3	<u>9.6</u> 0.0		<u>7.7</u> 0.2		<u>9.0</u> 0.2	
5 α -DHT		3.0 0.2	3.9 0.3		2.2 0.2		3.6 0.0	
Zwischenzone		1.7 0.1	2.8 0.0		3.4 0.1		0.8 0.0	
e-T		4.8 0.2	4.5 0.0		2.3 0.1		1.6 0.0	
6 β -OH-T		2.0 0.3	1.3 0.0		0.2 0.1		2.2 0.0	
T		<u>27.3</u> 0.5	<u>26.2</u> 0.3		<u>31.7</u> 0.5		<u>33.4</u> 0.1	
Zwischenzone		1.9 0.2	1.5 0.0		3.1 0.2		1.7 0.0	
5 β -Adion		0.7 0.1	0.5 0.0		0.4 0.1		0.5 0.0	
5 α -Adion		1.9 0.2	3.4 0.0		1.9 0.0		2.7 0.0	
16 α -OH-T		0.3 0.2	3.9 0.0		0.1 0.0		2.5 0.0	
Zwischenzone		0.6 0.2	0.4 0.0		0.9 0.0		2.3 0.0	
6 β -OH- Δ^4 -A		2.8 0.1	0.7 0.0		4.9 0.1		0.0 0.0	
Δ^4 -A		<u>14.0</u> 0.3	<u>18.3</u> 0.0		<u>19.1</u> 0.1		<u>22.1</u> 0.0	
16 α -OH- Δ^4 -A		2.0 0.3	4.0 0.0		1.5 0.1		1.4 0.0	
SUMME		92.9 <u>7.1</u>	98.7 <u>1.3</u>		96.1 <u>3.9</u>		99.1 <u>0.9</u>	

Tabelle 10: Verteilung der ^{14}C -Aktivität nach Inkubation von Mikrosomenfraktionen der Lebergewebsprobe von Pat. S.M. mit (4- ^{14}C)-Testosteron und Zusatz von glucuronierenden und wasserstoffübertragenden Co-fermenten (Inkubationslösung 4: Ansätze 5 und 6, Inkubationslösung 5: Ansätze 7 und 8).
Näheres siehe Text!

Fraktion	Patient:		A.E.		A.E.	
	Ansatz		F	K	F	K
	Zeit(h)		9		10	
			2.0		2.0	
Vorzone			0.8	0.4	0.1	0.1
5 α ,3 α -Adiol			0.3	<u>19.2</u>	0.1	<u>28.7</u>
5 β ,3 α -Adiol			0.7	1.2	0.5	1.8
Zwischenzone			4.8	0.2	0.3	0.4
5 α ,3 β -Adiol			<u>25.6</u>	0.5	<u>20.2</u>	1.8
Zwischenzone			3.3	0.8	1.4	1.1
5 α ,3 α -A			<u>13.6</u>	0.3	<u>11.4</u>	0.7
Zwischenzone			1.6	0.1	1.9	0.2
5 β ,3 α -A			1.1	0.1	0.7	0.6
5 α ,3 β -A			0.5	0.1	0.3	0.3
5 β -DHT			<u>5.9</u>	0.2	<u>7.9</u>	0.4
5 α -DHT			2.4	0.1	2.1	0.6
Zwischenzone			2.4	0.1	0.5	0.1
e-T			2.5	0.4	2.8	0.2
6 β -OH-T			3.3	0.0	1.8	1.5
T			1.5	0.1	6.3	0.2
Zwischenzone			1.8	0.1	0.3	0.2
5 β -Adion			0.3	0.2	0.3	0.1
5 α -Adion			0.3	0.3	0.1	0.3
16 α -OH-T			0.8	0.1	0.3	0.1
Zwischenzone			0.8	0.2	0.2	0.1
6 β -OH- Δ^4 -A			0.3	0.1	0.6	0.1
Δ^4 -A			0.3	0.1	0.2	0.1
16 α -OH- Δ^4 -A			0.2	0.3	0.3	0.1
SUMME			74.8	<u>25.2</u>	60.4	<u>39.6</u>

Tabellell: Verteilung der ^3H -Aktivität nach Inkubation von Mikrosomenfraktionen der Lebergewebsprobe von Pat.A.E. mit (1,2- ^3H)-Testosteron in Inkubationslösung 4 unter Zusatz von gluc. und wasserstoffübertragenden Cofermenten.

von Testosteron wiederzufinden. 14 - 22 % der Aktivität waren außerdem in der Zone von Δ^4 -Androstendion nachzuweisen, d.h. aus Testosteron wurden Δ^4 -Androstendion gebildet. 7.7 - 10.1 % der Aktivität waren im Bereich der Zone von 5β -Dihydrotestosteron bzw. $5\alpha,3\beta$ -Androsteron und 6.1 - 9.2 % im Bereich der Zone von $5\alpha,3\beta$ -Androstandiol vorhanden. Im Bereich der Zonen von $5\alpha,3\alpha$ - und $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol, 5α - und 5β -Androsteron und im Bereich von 5α -Dihydrotestosteron konnten nur geringe Aktivitätsmengen gemessen werden (0.1 - 4.2%). Nur 0.9 - 7.1 % der Ausgangsaktivität von (4 - ^{14}C)-Testosteron waren zu glucuronierten Metaboliten abgebaut worden ohne eine eindeutig vermehrte Anreicherung der Aktivität in Zonen von bestimmten Testosteronmetaboliten.

Verglichen mit den Mikrosomenansätzen mit glucuronierenden Cofermenten (Ansätze 3 und 4, siehe Tabelle 9) und den Ansätzen mit gluc. und wasserstoffübertragenden Cofermenten nach 30 Minuten Inkubation (Ansätze 5, 6, 7 und 8, siehe Tab. 10) konnte man bei den Ansätzen nach 2 Stunden Inkubation (Ansätze 9 und 10, siehe Tab. 11) einen verstärkten Abbau von Testosteron feststellen. In der Fraktion der freien Steroide waren im Bereich der Zone von Testosteron nur noch 1.5 - 6.3 % der Aktivität und im Bereich der Zone von Δ^4 -Androstendion 0.2 - 0.3 % vorhanden. In der Fraktion der freien Steroide erfolgte ein verstärkter Abbau zu $5\alpha,3\beta$ -Androstandiol (20 - 26 %) und zu $5\alpha,3\alpha$ -Androsteron (11 - 14 %), also zu 5α -konfigurierten Steroidmetaboliten. In den Zonen von $5\alpha,3\alpha$ - und $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol, 5β -Androsteron und in den Zonen von 5α - und 5β -Dihydrotestosteron waren deutlich geringere Aktivitätsmengen wiederzufinden (0.1 - 7.9 %).

Besonders auffällig war gegenüber den Mikrosomenansätzen nach 0.5-stündiger Inkubationszeit, aber sonst gleichen Inkubationsbedingungen, ein deutlich höherer Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten (25 - 40 %), vor allem zu $5\alpha,3\alpha$ -Androstandiolglucuronid (19 - 29 %).

3. Inkubation von (1,2-³H)-Testosteron mit perkutan gewonnenen Leberstanzzyclindern des Menschen

a) Inkubationsversuche mit Zusatz von glucuronsäure- übertragenden Cofermenten

Inkubationsversuche von histologisch unauffälligen Stanz-
zyclindern dreier Patienten (Gewicht: 6 - 8.4 mg) mit 1.4×10^{-10} Mol (1,2-³H)-Testosteron und Zugabe von glucuronieren-
den Cofermenten in 0.3 ml der Inkubationslösung 6 (s.S. 11)
über 2 Stunden ergaben, daß im Mittel über 82 % der ³H-
Aktivität in der Fraktion der freien Metaboliten in der
Zone von Testosteron lokalisiert waren. Nur in der Zone
von Δ^4 -Androstendion kam es zu einer geringen Anreicherung
von Aktivität (5.0-8.1 %), in den übrigen Zonen war kaum
Aktivität zu finden.

Ein Abbau von ³H-Testosteron zu glucuronierten Metaboliten
war kaum festzustellen, denn nur 1.7 - 4.8 % der Ausgangs-
aktivität waren in der Fraktion der glucuronierten Steroide
wiederzufinden. Es war also unter den gegebenen Bedingungen
nur eine geringe Glucuronierung von Testosteron bzw. Testo-
steronmetaboliten in Leberstanzzyclindern nachweisbar. Die
Aktivitätsverteilung der 3 Versuchsansätze mit histologisch
normalen Stanzzyclindern und Zugabe von glucuronierenden Co-
fermenten ist in Tabelle 12 wiedergegeben.

Die Inkubationsversuche mit Schnitten humaner Leber haben
gezeigt, daß durch Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäu-
reübertragenden Cofermenten der Abbau von Testosteron, ins-
besondere zu glucuronierten Metaboliten, gesteigert werden
kann und daß dann nicht nur eine Dehydrierung zu Δ^4 -Andro-
stendion stattfindet, sondern auch Hydrierungsprodukte von
(1,2-³H)-Testosteron in verstärktem Maße auftreten. Es wur-
den deshalb bei weiteren Versuchen mit Stanzzyclindern neben
glucuronierenden Cofermenten auch wasserstoffübertragende
Cofermente zugesetzt, und zwar NAD, NADH, NADP, Glucose-6-
phosphat und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase.

Patient: Fraktion	G.E.		E.P.		Z.H.	
	F	K	F	K	F	K
Vorzone	0.3	0.2	0.7	0.7	0.6	0.2
5 α ,3 α -Adiol	0.0	0.0	0.2	0.1	0.1	1.4
5 β ,3 α -Adiol	0.1	0.1	0.5	0.4	0.2	0.1
5 α ,3 β -Adiol	0.0	0.1	2.1	0.2	0.7	0.1
Zwischenzone	0.1	0.1	0.5	0.1	0.5	0.0
5 α ,3 α -A	0.1	0.1	0.1	0.9	0.2	0.0
Zwischenzone	0.4	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
5 β ,3 α -A	0.2	0.0	0.8	0.3	0.8	0.1
5 α ,3 β -A	0.2	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0
5 β -DHT	0.2	0.1	0.4	0.2	0.8	0.0
5 α -DHT	0.2	0.0	0.2	0.4	0.5	0.0
Zwischenzone	0.2	0.0	0.3	0.0	0.1	0.0
e-T	0.0	0.0	0.0	0.1	1.0	0.1
6 β -OH-T	0.2	0.1	0.0	0.3	0.2	0.0
T	<u>88.5</u>	0.3	<u>76.2</u>	0.2	<u>83.4</u>	0.2
Zwischenzone	0.0	0.1	1.1	0.2	0.7	0.2
5 β -Adion	0.2	0.0	0.7	0.1	0.2	0.1
5 α -Adion	0.3	0.0	0.3	0.1	0.6	0.0
16 α -OH-T	0.3	0.2	0.6	0.1	0.7	0.1
Zwischenzone	0.6	0.0	0.5	0.1	0.1	0.1
6 β -OH- Δ^4 -A	0.0	0.0	1.3	0.2	0.2	0.0
Δ^4 -A	<u>6.3</u>	0.2	<u>8.1</u>	0.1	<u>5.0</u>	0.0
16 α -OH- Δ^4 -A	0.1	0.1	0.2	0.1	0.7	0.1
SUMME	98.3	1.7	95.2	4.8	97.2	2.8

Tabelle 12: Verteilung der ^3H -Aktivität nach Inkubation von drei histologisch unauffälligen Leberstanzzylin-
dern mit (1,2- ^3H)-Testosteron und Zugabe von glu-
curonierenden Cofermenten zum Inkubationsmedium.
Näheres siehe Text.

F = Fraktion der freien Steroide

K = Fraktion der mit Glucuronsäure konjugierten
Steroide

b) Inkubation von histologisch normalen Leberstanzzyclindern mit Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten

Histologisch normale Leberstanzzyclinder von drei Patienten wurden mit 1.4×10^{-10} Mol (1,2- ^3H)-Testosteron unter Zusatz von UDP-Glucuronat, UDP-N-acetylglucosamin, ATP, NAD, NADH, NADP, Glucose-6-P und Glucose-6-P-dehydrogenase 2 Stunden in Inkubationslösung 4 inkubiert. In Tabelle 13 sind die Einzelergebnisse der ^3H -Aktivitätsverteilung zusammengestellt.

Bei den Inkubationsversuchen von menschlichen Leberschnitten mit (1,2- ^3H)-Testosteron und Zusatz von gluc. und wasserstoffübertragenden Cofermenten war ein sehr hoher Abbau von ^3H -Testosteron zu glucuronierten Testosteronmetaboliten festzustellen, und zwar vorwiegend zu den 5 β -hydrierten Verbindungen 5 β ,3 α -Androstadiolglucuronid und Ätiocholanolonglucuronid. Ein ähnliches Versuchsergebnis war bei der Inkubation von drei histologisch normalen Leberstanzzyclinder zu erhalten. So waren 79 - 91 % der ^3H -Aktivität in der Fraktion der glucuronierten Steroide wiederzufinden: 40 - 52 % des zugesetzten ^3H -Testosterons waren zu 5 β -Androstadiolglucuronid, 7 - 22 % zu Ätiocholanolonglucuronid und 2 - 15 % zu 5 α ,3 α -Androstadiolglucuronid bzw. 5 β ,3 β -Androstadiolglucuronid abgebaut worden. Die Aktivitätsanreicherung in der Fraktion der freien Steroide betrug 9 - 17 %; davon waren im Bereich der Zone von Testosteron nur noch 0.4 - 4.7 % vorhanden. Die Aktivitätswiederfindung in anderen Zonen, insbesondere im Bereich von 5 α -hydrierten Steroidverbindungen war gering.

Fraktion	Patient: L.P.		G.H.		G.L.	
	F	K	F	K	F	K
Vorzone	0.6	1.2	0.9	1.7	1.0	0.6
5 α ,3 α -Adiol	0.2	<u>14.6</u>	1.0	<u>14.4</u>	0.1	<u>1.8</u>
5 β ,3 α -Adiol	0.7	<u>39.6</u>	2.1	<u>51.8</u>	0.2	<u>51.7</u>
Zwischenzone	0.1	1.2	0.2	0.8	0.1	0.4
5 α ,3 β -Adiol	0.7	2.0	0.7	1.2	0.2	0.6
Zwischenzone	1.3	0.7	0.7	1.1	0.2	1.0
5 α ,3 α -A	0.6	0.9	1.0	1.9	1.2	3.0
Zwischenzone	0.3	0.1	0.4	0.2	0.2	0.6
5 β ,3 α -A	1.2	<u>7.1</u>	0.6	<u>8.1</u>	0.7	<u>21.5</u>
5 α ,3 β -A	0.4	0.1	0.2	0.2	0.1	0.4
5 β -DHT	0.3	0.5	0.6	0.6	1.6	1.2
5 α -DHT	0.7	0.4	0.5	0.3	0.3	0.9
Zwischenzone	0.3	0.2	0.1	0.2	0.2	1.0
e-T	0.9	5.3	0.6	0.3	0.4	1.0
6 β -OH-T	0.4	0.1	0.7	0.1	0.1	0.8
T	<u>4.7</u>	0.9	<u>3.0</u>	0.5	<u>0.4</u>	1.5
Zwischenzone	1.2	0.5	0.7	0.5	0.7	2.1
5 β -Adion	0.4	0.2	0.2	0.1	0.3	0.1
5 α -Adion	1.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1
16 α -OH-T	0.6	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2
Zwischenzone	0.6	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2
6 α -OH- Δ^4 -A	1.2	0.3	0.2	0.0	0.3	0.2
Δ^4 -A	0.8	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
16 α -OH- Δ^4 -A	0.3	2.3	0.1	0.1	0.1	0.0
SUMME	21.5	<u>78.5</u>	15.3	<u>84.7</u>	9.1	<u>90.9</u>

Tabelle 13: Verteilung der ^3H -Aktivität nach Inkubation von (1,2- ^3H)-Testosteron mit histologisch normalen Leberstanzzyllindern von 3 Patienten unter Zugabe von gluc. und wasserstoffübertragenden Cofermenten zum Inkubationsmedium.

Näheres siehe Text.

c) Inkubation von pathologisch veränderten Leberstanz-
zylindern mit Zusatz von wasserstoff- und glucuron-
säureübertragenden Cofermenten

Wegen der recht unterschiedlichen Histologie der einzelnen Leberstanzzylinder fanden sich nur wenige Proben, die in ihrer pathologischen Struktur annähernd vergleichbar waren. Im folgenden sollen die Ergebnisse von 10 Fällen mit höhergradiger Leberzellverfettung, von 8 Fällen mit chronischer Hepatitis und von 4 Fällen mit Leberzirrhose mit den Ergebnissen der drei histologisch normalen Leberstanzzylinder verglichen werden. In den Tabellen 14, 15 und 16 ist die Verteilung der ^3H -Aktivität in den verschiedenen Gasfraktionen nach Inkubation von (1,2- ^3H)-Testosteron mit Leberstanzzylindern von 10 Patienten mit Fettleber, in den Tabellen 17 und 18 mit Stanzzylindern von 8 Patienten mit chronischer Hepatitis und in Tabelle 19 mit Stanzzylindern von 4 Patienten mit Leberzirrhose wiedergegeben. Zum Vergleich sollen die Ergebnisse von 3 Patienten mit normaler Leberhistologie dienen, die in Tabelle 13 (s.S.66) zu finden sind.

Die Menge der ^3H -Aktivität, die bei den Versuchen mit Fettleber in der Zone von Testosteron in der Fraktion der freien Steroide wiedergefunden wurde, betrug 0.2 - 17 % und lag im Mittel etwas höher als bei den Versuchen mit normalem Lebergewebe (0.4 - 4.7 %). Bei den 8 Fällen mit chronischer Hepatitis (3 - 47 %) und bei den 4 Versuchen mit cirrhotisch verändertem Lebergewebe (6 - 65 %) war die im Bereich von Testosteron wiedergefundene ^3H -Aktivität deutlich höher als bei den Proben mit normaler Histologie. Wie aus Abbildung 14 zu ersehen ist, war der Abbau von ^3H -Testosteron zu freien Metaboliten durch Fettlebergewebe (4 - 63 %) im Vergleich zu den Befunden mit histologisch normalem Lebergewebe (9 - 17 %) nicht vermindert, sondern im Mittel erhöht. Die 8 Proben mit einer chronischen Hepatitis (19 - 79 %) und die 4 Proben mit Zirrhosegewebe (34 - 78 %) zeigten ebenfalls einen höheren

Fraktion	Patient: O.E.		H.L.		F.J.		H.A.	
	F	K	F	K	F	K	F	K
Vorzone	0.7	0.3	1.1	0.1	0.9	0.9	5.2	1.0
5 α ,3 α -Adiol	0.4	<u>0.2</u>	0.5	<u>0.8</u>	0.6	<u>10.2</u>	0.9	<u>8.4</u>
5 β ,3 α -Adiol	<u>15.4</u>	<u>23.3</u>	<u>2.6</u>	<u>32.3</u>	<u>4.8</u>	<u>34.5</u>	<u>4.5</u>	<u>35.9</u>
Zwischenzone	0.4	0.3	0.3	0.8	0.4	0.3	0.7	0.4
5 α ,3 β -Adiol	1.1	0.7	1.5	1.8	1.4	1.5	1.6	1.4
Zwischenzone	0.8	0.8	1.0	1.1	1.5	1.5	1.4	0.5
5 α ,3 α -A	2.2	0.7	0.9	1.4	1.5	1.1	1.6	0.8
Zwischenzone	0.5	0.3	0.5	0.6	1.3	0.9	0.9	0.5
5 α ,3 α -A	<u>15.0</u>	<u>15.8</u>	<u>2.1</u>	<u>12.7</u>	<u>1.4</u>	<u>5.3</u>	<u>8.6</u>	<u>4.4</u>
5 α ,3 β -A	0.2	0.1	0.1	0.2	0.4	0.1	0.3	0.1
5 α -DHT	1.8	0.8	2.1	0.8	1.2	0.8	1.1	0.4
5 α -DHT	0.7	0.6	1.2	0.8	1.6	0.7	1.5	0.6
Zwischenzone	0.3	0.1	0.3	0.1	0.4	0.1	0.5	0.1
e-T	2.2	0.2	1.0	0.8	1.8	0.4	1.6	0.3
6 β -OH-T	0.4	0.2	1.4	1.7	0.4	0.4	0.7	0.1
T	<u>2.9</u>	0.5	<u>5.8</u>	1.4	<u>9.0</u>	0.9	<u>4.4</u>	0.7
Zwischenzone	3.2	0.6	1.2	0.6	1.5	0.4	2.1	0.2
5 β -Adion	0.4	0.2	2.4	0.2	1.1	0.2	1.0	0.2
5 α -Adion	0.2	0.1	0.5	1.6	1.0	0.3	1.0	0.5
10 α -OH-T	1.0	0.1	0.5	0.3	1.1	0.5	0.7	0.0
Zwischenzone	0.4	0.1	0.0	0.2	0.2	0.2	0.7	0.2
6 α -OH- Δ^4 -A	0.2	0.3	1.0	0.2	0.3	2.4	0.8	0.2
17 α -A	1.6	0.0	1.5	0.2	0.9	0.3	0.8	0.3
17 β -OH- Δ^4 -A	0.1	0.0	0.3	0.2	0.3	0.3	0.4	0.1
Summe	52.0	<u>77.1</u>	30.0	<u>10.0</u>	35.0	<u>64.2</u>	42.8	<u>57.2</u>

Tabelle 14: Verteilung der ^3H -Aktivität nach Inkubation von (1,2- ^3H)-Testosteron mit Leberstanzzy lindern von 4 Patienten mit Fettleber unter Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten zum Inkubationsmedium. Näheres siehe Text.

Patient:	G.O.		S.J.	
	F	K	F	K
Vorzone	2.3	1.1	2.0	1.8
5 α ,5 α -Adiol	0.4	<u>4.2</u>	1.0	<u>6.9</u>
5 β ,5 α -Adiol	1.5	<u>39.9</u>	1.7	<u>38.7</u>
Zwischenzone	0.5	1.0	0.7	1.7
5 α ,3 β -Adiol	1.1	0.7	1.2	2.6
Zwischenzone	0.6	1.1	1.3	1.1
5 α ,3 α -A	1.3	2.9	0.9	1.2
Zwischenzone	1.0	5.3	0.8	0.6
5 β ,3 α -A	1.8	<u>7.7</u>	1.4	<u>6.0</u>
5 α ,3 β -A	0.4	1.9	0.5	1.0
5 β -DHT	0.9	1.1	1.1	0.7
5 α -DHT	1.2	0.3	0.8	0.7
Zwischenzone	0.3	0.2	0.7	0.7
e-T	1.2	0.3	1.0	0.6
6 β -OH-T	0.4	0.7	1.0	0.5
T	<u>7.4</u>	0.3	<u>2.1</u>	1.2
Zwischenzone	1.6	0.7	0.8	1.1
5 β -Adion	0.6	0.1	0.7	0.8
5 α -Adion	0.8	0.4	0.8	0.6
16 α -OH-T	0.5	0.3	1.5	0.6
Zwischenzone	1.1	0.3	1.9	0.6
6 β -OH- Δ^4 -A	0.8	0.1	0.7	0.4
Δ^4 -A	0.9	0.3	0.8	1.0
17 α -OH- Δ^4 -A	0.7	0.1	0.6	3.0
SUMME	28.9	<u>71.1</u>	25.9	<u>74.1</u>

Tabelle 16: Verteilung der ^3H -Aktivität nach Inkubation von (1,2- ^3H)-Testosteron mit Leberstanzzyllindern von 2 Patienten mit Fettleber unter Zugabe von wasserstoffübertragenden und glucuronsäureübertragenden Cofermenten zum Inkubationsmedium.
Näheres siehe Text.

Patient: B.A.			H.H.		K.R.		S.E.	
Fraktion	F	K	F	K	F	K	F	K
Vorzone	1.2	0.3	2.3	1.7	1.2	1.2	3.8	0.9
5 α ,3 α -Adiol	1.2	1.1	0.6	3.8	0.7	4.1	1.0	0.6
5 β ,3 α -Adiol	<u>21.9</u>	<u>3.8</u>	<u>1.7</u>	<u>29.7</u>	<u>7.9</u>	<u>29.2</u>	<u>9.7</u>	<u>11.4</u>
Zwischenzone	1.7	0.6	0.2	1.4	1.1	0.7	0.7	0.4
5 α ,3 β -Adiol	1.5	0.3	1.4	2.6	2.1	0.9	2.2	0.5
Zwischenzone	1.6	0.4	1.6	1.1	2.5	1.2	4.9	0.5
5 α ,3 γ -A	4.2	0.5	1.4	0.8	1.2	0.6	1.9	0.3
Zwischenzone	0.5	0.1	1.1	0.2	0.8	0.4	1.8	0.2
5 β ,3 α -A	<u>34.1</u>	<u>2.6</u>	<u>1.6</u>	<u>6.0</u>	<u>8.8</u>	<u>5.3</u>	<u>8.0</u>	<u>0.3</u>
5 α ,3 β -A	0.2	0.1	0.4	0.2	0.5	0.2	0.6	0.2
5 β -DHT	1.4	0.2	1.6	0.6	1.7	2.1	6.7	0.2
5 α -DHT	1.2	0.5	1.6	0.6	1.4	0.6	2.7	0.3
Zwischenzone	0.7	0.0	0.8	0.1	0.5	0.4	1.8	0.1
e-T	1.7	0.2	2.1	0.3	2.6	0.3	3.9	0.7
6 β -OH-T	0.5	0.1	0.5	0.1	0.4	0.1	1.2	0.2
T	<u>3.0</u>	0.4	<u>8.8</u>	1.2	<u>5.2</u>	0.4	<u>16.7</u>	0.5
Zwischenzone	1.9	0.5	2.4	0.6	3.2	0.2	1.9	0.4
5 β -Adion	0.7	0.1	0.9	0.2	0.7	0.0	0.7	0.5
5 α -Adion	0.2	0.1	4.2	0.2	3.9	0.3	1.4	0.4
16 α -OH-T	0.8	0.1	0.7	0.5	1.6	0.1	1.3	0.2
Zwischenzone	1.3	0.1	0.7	1.4	0.4	0.2	1.5	0.8
6 β -OH- Δ^4 -A	0.3	0.2	1.6	0.1	0.7	0.1	1.6	0.3
Δ^4 -A	0.4	0.2	2.7	0.1	1.0	0.2	2.1	0.5
16 α -OH- Δ^4 -A	0.1	0.1	0.4	0.1	0.7	0.1	1.8	0.1
SUMME	82.3	<u>17.7</u>	41.4	<u>58.6</u>	50.5	<u>49.5</u>	79.7	<u>20.3</u>

Tabelle 17: Verteilung der ^3H -Aktivität nach Inkubation von (1,2- ^3H)-Testosteron mit Leberstanzzyllindern von 4 Patienten mit chronischer Hepatitis unter Zugabe von wasserstoffübertragenden und glucuronsäureübertragenden Cofermenten zum Inkubationsmedium. Näheres siehe Text.

Fraktion	Patient: S.R.		B.U.		D.W.		L.R.	
	F	K	F	K	F	K	F	K
Vorzone	0.9	0.5	0.3	0.3	1.5	1.2	0.7	0.7
5 α ,3 α -Adiol	2.5	2.8	0.6	2.4	0.5	1.8	0.6	2.2
5 β ,3 α -Adiol	<u>7.4</u>	<u>23.8</u>	<u>6.9</u>	<u>21.1</u>	<u>2.6</u>	<u>9.6</u>	<u>2.2</u>	<u>27.7</u>
Zwischenzone	0.5	0.4	0.2	0.5	0.4	0.3	0.3	0.6
5 α ,3 β -Adiol	2.0	0.7	0.4	0.8	2.2	2.6	3.6	1.1
Zwischenzone	2.8	0.8	0.5	0.7	6.0	1.4	2.6	1.9
5 α ,3 α -A	1.8	0.5	0.4	0.7	1.1	2.1	1.3	2.7
Zwischenzone	1.2	0.3	0.4	0.2	1.7	0.6	1.3	1.0
5 β ,3 α -A	<u>6.4</u>	<u>2.8</u>	<u>2.5</u>	<u>4.9</u>	<u>5.9</u>	<u>9.8</u>	<u>3.1</u>	<u>10.3</u>
5 α ,3 β -A	0.6	0.1	0.2	0.2	0.5	0.3	0.5	0.2
5 α -DHT	1.7	0.3	2.0	0.4	2.9	0.8	1.5	0.6
5 α -DHT	2.6	0.6	0.9	0.1	3.1	0.9	3.2	0.8
Zwischenzone	0.8	0.1	0.5	0.1	4.7	0.5	0.3	0.5
e-T	3.2	1.4	0.0	0.1	2.7	0.6	2.9	0.7
6 β -OH-T	1.2	0.2	0.0	0.1	1.9	0.4	1.2	3.8
T	<u>13.0</u>	0.3	<u>47.2</u>	0.7	<u>4.8</u>	1.3	<u>7.4</u>	3.8
Zwischenzone	2.6	0.5	0.7	0.2	3.6	0.3	0.8	0.6
5 β -Adion	2.1	0.1	0.2	0.0	1.5	0.1	0.5	0.3
5 α -Adion	1.4	0.2	1.5	0.0	1.4	0.2	1.4	0.3
16 α -OH-T	1.2	0.1	0.1	0.3	1.2	0.4	1.0	0.2
Zwischenzone	1.0	0.2	0.0	0.1	1.6	0.2	0.4	0.1
6 β -OH- Δ^4 -A	1.1	0.0	0.4	0.1	0.7	0.3	1.3	0.1
5 α -A	4.7	0.1	0.3	0.1	1.2	0.2	1.2	0.2
16 α -OH- Δ^4 -A	0.5	0.3	0.3	0.1	0.5	0.2	0.3	0.2
SUMME	63.1	<u>36.9</u>	66.3	<u>33.7</u>	64.0	<u>36.0</u>	39.4	<u>60.6</u>

Tabelle 18: Verteilung der ^3H -Aktivität nach Inkubation von (1,2- ^3H)-Testosteron mit Leberstanzzyllindern von 4 Patienten mit chronischer Hepatitis unter Zugabe von wasserstoffübertragenden und glucuronsäureübertragenden Cofermenten zum Inkubationsmedium. Näheres siehe Text.

Patient: P.J.			Z.I.		G.L.		G.T.	
Fraktion	F	K	F	K	F	K	F	K
Vorzone	0.6	0.1	0.7	0.1	2.5	0.5	1.1	0.2
5 α ,3 α -Adiol	2.0	0.0	1.1	0.0	3.1	0.3	1.5	1.3
5 β ,3 α -Adiol	<u>4.1</u>	0.1	<u>1.9</u>	0.2	<u>1.9</u>	0.3	<u>37.4</u>	<u>7.7</u>
Zwischenzone	0.1	0.0	0.4	0.0	0.6	0.1	6.4	0.9
5 α ,3 β -Adiol	2.0	0.1	1.9	0.0	2.9	0.2	3.3	0.5
Zwischenzone	0.5	0.0	0.9	0.0	1.3	0.5	2.0	0.6
5 α ,3 α -A	1.1	0.0	2.5	0.0	3.0	0.2	1.2	0.3
Zwischenzone	2.1	0.1	0.8	0.0	0.6	0.4	0.5	0.2
5 β ,3 α -A	0.0	0.0	3.3	0.1	1.5	0.3	5.7	2.0
5 α ,3 β -A	0.1	0.0	0.6	0.0	0.5	0.2	1.8	0.2
5 β -DHT	2.3	0.0	4.1	0.0	3.6	0.2	2.4	0.2
5 α -DHT	0.1	0.0	1.3	0.0	3.7	0.1	1.8	0.4
Zwischenzone	0.3	0.1	1.0	0.0	1.2	0.1	1.8	0.3
e-T	0.1	0.0	0.5	0.0	1.0	0.1	1.0	0.7
6 β -OH-T	1.3	0.0	9.9	0.0	0.6	0.1	0.6	0.1
T	<u>65.4</u>	0.1	<u>47.8</u>	0.3	<u>44.9</u>	0.2	<u>5.8</u>	0.4
Zwischenzone	1.1	0.1	0.0	0.0	1.8	0.2	0.8	0.1
5 β -Adion	0.2	0.1	0.4	0.0	2.3	0.1	1.0	0.1
5 α -Adion	0.2	0.0	0.6	0.0	4.7	0.1	1.6	0.1
16 α -OH-T	0.4	0.0	1.5	0.0	2.7	0.1	1.0	0.1
Zwischenzone	1.2	0.0	2.5	0.0	3.1	0.1	0.6	0.0
6 β -OH- Δ^4 -A	0.6	0.0	1.9	0.0	1.4	0.0	0.8	0.1
Δ^4 -A	<u>12.7</u>	0.0	<u>11.6</u>	0.0	<u>6.2</u>	0.1	<u>3.1</u>	0.1
16 α -OH- Δ^4 -A	0.5	0.0	2.9	0.0	0.3	0.1	0.6	0.0
SUMME	99.1	<u>0.9</u>	99.2	<u>0.8</u>	95.5	<u>4.5</u>	83.6	<u>16.4</u>

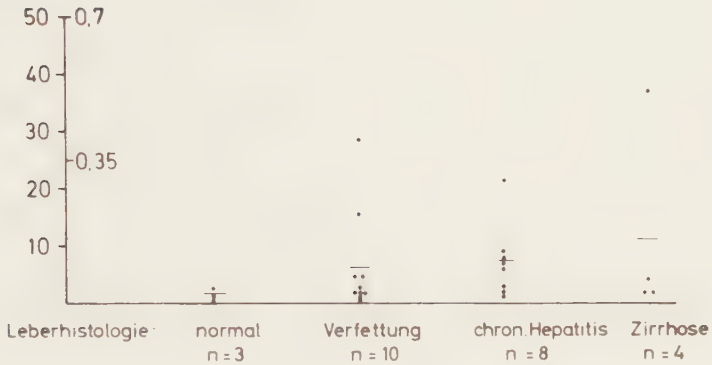
Tabelle 19: Verteilung der ^3H -Aktivität nach Inkubation von (1,2- ^3H)-Testosteron mit Leberstanzzy lindern von 4 Patienten mit Lebercirrhose unter Zugabe von wasserstoffübertragenden und glucuronsäureübertragenden Cofermenten zum Inkubationsmedium. Näheres siehe Text.

Abbau von ^3H -Testosteron zu freien Metaboliten. Die Umwandlung von Testosteron zu freiem $5\beta,3\alpha$ -Androsteron und freiem $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol war bei den Proben von Fettleber und chronischer Hepatitis gegenüber den Proben mit normaler Histologie stark erhöht und bei den Fällen von Leberzirrhose gering erhöht (siehe Abbildungen 13 und 14). Bei den 4 cirrhotisch veränderten Lebergewebsproben fand sich in der Fraktion der freien Steroide außer im Bereich der Zonen von Testosteron, $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol und $5\beta,3\alpha$ -Androsteron zusätzlich eine Aktivitätsanreicherung in der Zone von Δ^4 -Androstendion (1.1 - 12.7 %). Der Abbau von ^3H -Testosteron zu glucuronierten Metaboliten verlief bei den verschiedenen Proben unterschiedlich. Während in den 3 Proben von histologisch normalen Leberstanzzyclindern 79 - 91 % des ^3H -Testosterons zu glucuronierten Metaboliten abgebaut worden waren, betrug die in der Fraktion der glucuronierten Steroide wiedergefundene ^3H -Aktivität bei den Proben von Fettleber 20 - 96 %, bei den Proben von chronischer Hepatitis 20 - 61 % und in den Fällen von Leberzirrhose nur 0.8 - 16.4 %. In Abbildung 15 findet sich eine Gegenüberstellung der Ergebnisse. Die Umwandlung von ^3H -Testosteron zu den glucuronierten Metaboliten Ätiocholanolonglucuronid, $5\alpha,3\alpha$ -Androstandiolglucuronid und zu $5\beta,3\alpha$ -Androstandiolglucuronid war verglichen mit den Proben von normaler Histologie bei den Proben von Fettleber mäßig, bei den Fällen von chronischer Hepatitis stark erniedrigt und bei den Fällen mit Zirrhosegewebe kaum nachweisbar. In den Abbildungen 13 und 14 ist der Abbau von Testosteron zu $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol und zu $5\beta,3\alpha$ -Androstandiolglucuronid bzw. zu $5\beta,3\alpha$ -Androsteron und $5\beta,3\alpha$ -Androsteronglucuronid in Leberstanzzyclindern unterschiedlicher Histologie wiedergegeben. Zusammenfassend läßt sich bei Zylindern mit normaler Histologie ein sehr hoher Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten feststellen, Fettleberproben und Proben von chronischer Hepatitis bildeten im Mittel weniger Glucuronidmetaboliten, wenn auch mit einer erheblichen Streubreite und Proben von Leberzirrhose zeigen nur eine geringe oder kaum eine Bil-

Legende zu Abb. 13:

Der Maßstab der Ordinate gibt links den prozentualen Abbau der eingesetzten Aktivität (s.S. 16) und rechts den absoluten Abbau in $[\text{Mol} \times 10^{-10}]$ wieder. Das Gewicht der eingesetzten Stanzzyylinder betrug 6-10 mg Feuchtgewicht. Aus experimentellen Gründen wurde auf eine Korrektur der Gewichtsschwankungen verzichtet (Mittelwert = 8 mg)

Abbau von TESTOSTERON in Leberstanz- zylindern zu $5\beta, 3\alpha$ -Androstandiol



Abbau von TESTOSTERON in Leberstanz- zylindern zu $5\beta, 3\alpha$ -Androstandiolglucuronid

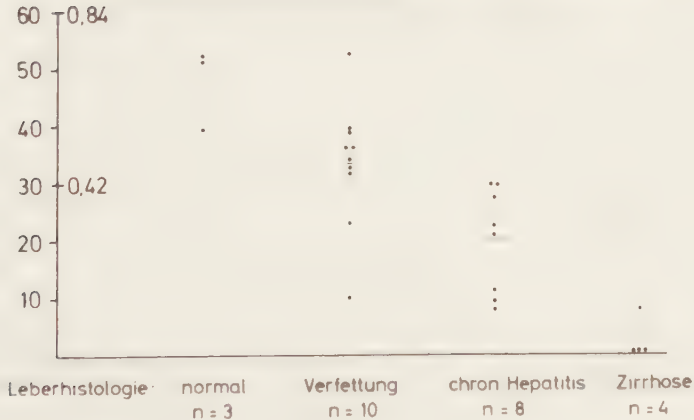
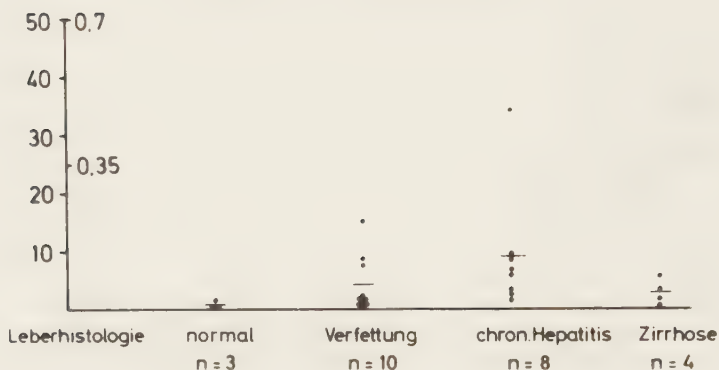


Abb.13: Die Umwandlung von $(1,2-^3\text{H})$ -Testosteron in $(1,2-^3\text{H})$ - $5\beta, 3\alpha$ -Androstandiol (obere Abbildung) und $(1,2-^3\text{H})$ - $5\beta, 3\alpha$ -Androstandiolglucuronid (untere Abbildung) durch histologisch normale und pathologisch veränderte Leberstanzzyylinder von insgesamt 25 Patienten.

Abbau von TESTOSTERON in Leberstanz- zylindern zu Ätiocholanolon



Abbau von TESTOSTERON in Leberstanz- zylindern zu Ätiocholanolonglucuronid

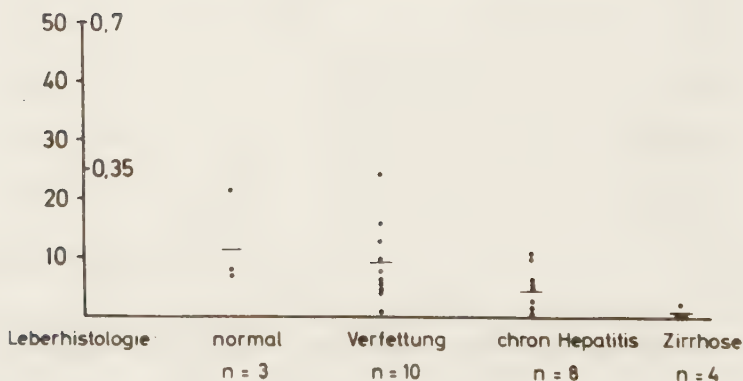
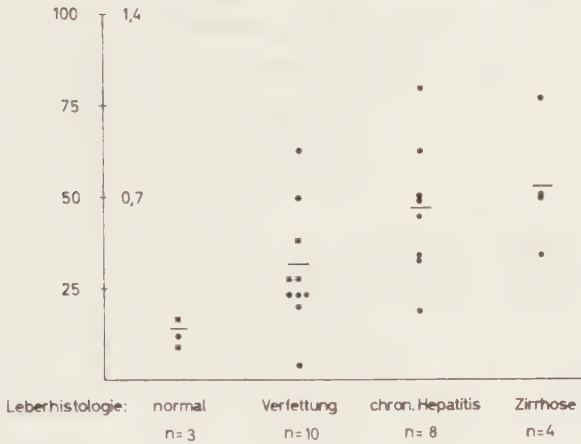


Abb.14: Die Umwandlung von (1,2-³H)-Testosteron in (1,2-³H)-5 β ,3 α -Androsteron (obere Abbildung) und (1,2-³H)-5 β ,3 α -Androsteronglucuronid (untere Abbildung) durch histologisch normale und pathologisch veränderte Leberstanzzylinder von insgesamt 25 Patienten.

Siehe auch Legende zu Abb. 13, S. 75

Abbau von Testosteron zu freien Metaboliten



Abbau von Testosteron zu glucuronisierten Metaboliten

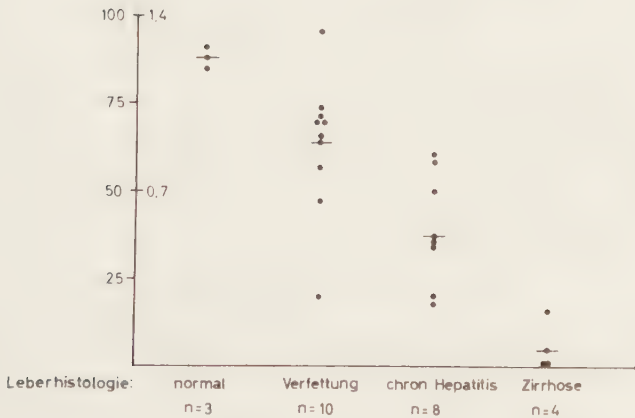


Abb.15: Der Abbau von (1,2-³H)-Testosteron zu freien (obere Abbildung) und glucuronisierten Metaboliten (untere Abbildung) durch histologisch normale und pathologisch veränderte Leberstanzzyylinder von insgesamt 25 Patienten.

Siehe auch Legende zu Abb. 13, S. 75

dung von Glucuronidmetaboliten (siehe Abbildung 15).

Diese Befunde erklären, warum histologisch normale Leberstanz-
zylinder wenig freie und pathologisch verändertes Lebergewebe
relativ viel freie Metaboliten aus Testosteron bildeten. Auf-
fällig ist jedoch die große Streubreite der Ergebnisse bei den
Inkubationsversuchen mit Fettlebergewebe und chronischer Hepa-
titis. Auch die Schwere der histologisch erkennbaren Leberer-
krankung stand in keinem eindeutigen Zusammenhang zum Ausmaß
der Glucuronisierungskapazität der entsprechenden Gewebsprobe.
In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der histologisch untersuch-
ten Leberstanzzylinder von 10 Patienten mit Verfettung und
von 8 Patienten mit chronischer Entzündung wiedergegeben.

Patient:

Histologie:

O.E.	60 % Leberzellverfettung, keine Entzündung.
H.L.	70 % Leberzellverfettung.
F.I.	10 % Leberzellverfettung, keine Entzündung.
H.A.	Geringe Verfettung und geringe unspezifische Entzündung.
S.H.	10 % Leberzellverfettung, keine Entzündung.
S.H.	40 % Leberzellverfettung ohne Entzündung.
E.A.	60 % Leberzellverfettung und geringe unspezifische Entzündung.
F.W.	50 % Leberzellverfettung mit mässiger Entzündung.
G.O.	50 % Leberzellverfettung, V.a. Drogencholestase.
S.J.	10 % Leberzellverfettung und herdförmige unspezifische Entzündung.
B.A.	Chronisch-persistierende Hepatitis ohne Leberverfettung.
H.H.	Chronisch-persistierende Hepatitis.
K.R.	Mässige unspezifische Entzündung mit geringer Verfettung.
S.E.	Mässige portale Entzündung und Fibrose.
S.R.	Geringe, unspezifische Entzündung.
B.U.	Mässige portale Entzündung.
D.W.	Retikulo-histiozytäre Knötchen, geringe Entzündung.
L.R.	V.a.akute Hepatitis mit fraglicher Verfettung.

Tabelle 20: Übersicht über die histiologischen Leberveränderungen bei 10 Patienten mit Leberzellverfettung und 8 Patienten mit chronischer Hepatitis.
Ausführliche Histologie siehe Anhang Seite 407.

V. Besprechung der Ergebnisse

Inkubationsversuche von Leberschnitten des Menschen mit Testosteron ohne Zugabe von Cofermenten bzw. mit Zugabe von glucuronsäureübertragenden Cofermenten zum Inkubationsmedium ergaben, daß Testosteron vorwiegend zu freien, aber nur in geringem Ausmaß zu glucuronierten Metaboliten umgewandelt wird. In der Fraktion der freien Steroide fanden sich bei beiden Ansätzen als Metaboliten vorwiegend Δ^4 -Androstendion (13-44 %) und $5\beta,3\alpha$ -Androsteron (2 - 15 %). Ein Abbau zu 5α -hydrierten Metaboliten (z.B. $5\alpha,3\alpha$ -Androsteron) konnte nicht sicher festgestellt werden.

Verglichen mit den Versuchsansätzen von Leberschnitten ohne Cofermente war bei Zugabe von glucuronierenden Cofermenten nur eine gering erhöhte Abbaurate von Testosteron zu den Steroidglucuroniden $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol- (4 - 7 %) und Testosteron-glucuronid (2 - 4 %) festzustellen. Die Ursache für die geringe Glucuronierung von Testosteron und Testosteronmetaboliten könnte primär die geringe Hydrierung von Testosteron sein, die sich unter den gewählten Inkubationsbedingungen durch eine Abnahme der Konzentration von wasserstoffübertragenden Cofermenten in den Leberzellen erklären ließe. Es wurden deshalb weitere Inkubationen von Leberschnitten mit ^{14}C - bzw. ^3H -Testosteron unter Zugabe von glucuronsäure- und wasserstoffübertragenden Cofermenten zum Inkubationsmedium durchgeführt.

Die Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten bewirkte - verglichen mit Versuchen ohne Cofaktoren oder nur mit glucuronsäureübertragenden Cofermenten - einen verstärkten Abbau von Testosteron zu glucuronierten Steroidmetaboliten (63 - 81 %) und zwar zu $5\beta,3\alpha$ -hydrierten Metaboliten ($5\beta,3\alpha$ -Androstandiolglucuronid 12 - 23 % und $5\beta,3\alpha$ -Androsteronglucuronid 11 - 24 %), aber auch zu $5\alpha,3\alpha$ -hydrierten Metaboliten ($5\alpha,3\alpha$ -Androstandiolglucuronid 6 - 21 % und $5\alpha,3\alpha$ -Androsteronglucuronid 1 - 5 %). Der Abbau von Testosteron zu freien Metaboliten war dagegen stark reduziert; in der Zone

von Δ^4 -Androstendion waren nur noch 0.5 - 1 % der Aktivität des zugesetzten Testosterons vorhanden. Ein Überwiegen von 5β -hydrierten Metaboliten von Testosteron zeigte sich auch in der Fraktion der freien Steroide beim Vergleich von gebildetem $5\beta,3\alpha$ - und $5\alpha,3\alpha$ -Androsteron. Diese Ergebnisse lassen sich gut in Übereinstimmung bringen mit den Befunden von BAULIEU et al. (1964), die gefunden haben, daß Testosteron bei der Frau vorwiegend zu $5\beta,3\alpha$ -Androsteronglucuronid, beim Mann in geringem Ausmaß zusätzlich auch zu $5\alpha,3\alpha$ -Androsteronglucuronid umgewandelt wird. Im Gegensatz zu den in vitro erhobenen Befunden und im Gegensatz zu den Ergebnissen von BAULIEU et al. haben SCHRIEFERS et al. (1972) nachgewiesen, daß in der Rattenleber beim weiblichen Tier fast ausschließlich $5\alpha,3\alpha$ -Androsteronglucuronid gebildet wird, während beim männlichen Tier $5\alpha,3\alpha$ - und $5\beta,3\alpha$ -Androsteronglucuronid aus Testosteron entstehen.

Die Inkubationsversuche mit Leberschnitten ergaben eine vorwiegende 5β -Hydrierung, jedoch auch eine 5α -Hydrierung von Testosteron und Testosteronmetaboliten. Da es möglich schien, daß 5α -Reduktase-Aktivität bei den Versuchen mit Gewebeschnitten nicht in einem Maß zur Wirkung kam wie sie in der Leberzelle vorhanden ist, wurden subzelluläre Fraktionen aus menschlicher Leber mit ^{14}C - bzw. ^3H -Testosteron inkubiert, um zu klären, welche Leberzellkompartimente, und in welchem Ausmaß, Testosteron zu 5α -hydrierten freien und glucuronierten Metaboliten umsetzen. Zusätzlich sollte untersucht werden, welche subzellulären Strukturen die 5β -Hydrierung und Glucuronierung von Testosteron bewirken.

In Abhängigkeit von den gewählten Cofaktoren wurden bei den Inkubationsexperimenten mit Mikrosomenfraktionen von Leberproben unterschiedliche Ergebnisse erzielt.

Bei Zugabe eines NADPH-regenerierenden Systems zu den Inkubationsversuchen waren vorwiegend die 5α -Verbindungen $5\alpha,3\beta$ -

Androstandiol (14 - 21 %), **5 α -Dihydrotestosteron** (14 - 15 %) und **5 α ,3 α -Androsteron** (5 - 6 %) gebildet worden. Ein Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten war nicht nachzuweisen.

Bei Zugabe nur von glucuronierenden Cofermenten fand sich als Hauptmetabolit Δ^4 -Androstendion (19 - 23 %). Insgesamt gesehen war der Abbau von Testosteron zu freien, vor allem aber zu glucuronierten Androgenen gering.

Ähnlich niedrige Glucuronisierungsraten fanden sich bei Zugabe von glucuronsäure- und wasserstoffübertragenden Cofermenten zu Mikrosomenansätzen nach 30 Minuten Inkubation. Der Abbau von Testosteron zu freien Steroidmetaboliten war dagegen gesteigert und es fanden sich neben Δ^4 -Androstendion (14 - 22 %) als Metaboliten **5 α ,3 β -Androstandiol** (6 - 9 %) und **5 α ,3 β -Androsteron** bzw. **5 β -Dihydrotestosteron** (9 - 10 %).

Verglichen mit den Mikrosomenansätzen mit glucuronierenden Cofermenten und den Ansätzen mit glucuronsäure- und wasserstoffübertragenden Cofermenten nach 30 Minuten Inkubation konnte man bei Mikrosomenansätzen mit glucuronsäure- und wasserstoffübertragenden Cofermenten nach 2 Stunden Inkubation einen verstärkten Abbau von Testosteron feststellen. In der Fraktion der freien Steroide erfolgte ein gesteigerter Abbau zu **5 α ,3 β -Androstandiol** (20 - 26 %) und zu **5 α ,3 α -Androsteron** (11 - 14 %), also zu 5 α -konfigurierten Steroidmetaboliten. In den Zonen von 5 β -hydrierten Verbindungen fanden sich nur geringe Aktivitätsmengen. Besonders auffällig war gegenüber den Mikrosomenansätzen nach 0.5-stündiger Inkubationszeit, aber sonst gleichen Inkubationsbedingungen, ein deutlich höherer Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten (25 - 40 %), vor allem zu **5 α ,3 α -Androstandiolglucuronid** (19 - 29 %).

Nicht geklärt werden konnte, ob der gesteigerte Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten primär zeitabhängig ist oder sekundär von einer Bereitstellung hydrierter Testosteronmetaboliten abhängt, die dann anschließend mit Glucuronsäure konjugiert werden.

Im Gegensatz zu den Befunden einer vorwiegenden 5 α -Hydrierung von Testosteron in menschlichen Mikrosomenfraktionen konnten wir bei Inkubationsversuchen von Zytosolfraktionen humaner Leber eine bevorzugte 5 β -Hydrierung von Testosteron nachweisen. Bei Zugabe eines NADPH-regenerierenden Systems zu den Inkubationsversuchen waren vorwiegend die 5 β -Verbindungen 5 β ,3 α -Androstadiol, 5 β ,3 α -Androsteron und 5 β -Dihydrotestosteron gebildet worden. Ein gesicherter Abbau von Testosteron in Zytosolfraktionen zu glucuronierten Metaboliten war bei diesen Versuchen ebenso wenig nachzuweisen wie bei den Versuchen mit Zugabe von glucuronierenden Cofermenten. Auch hier fanden sich in der Fraktion der freien Steroide die genannten 5 β -hydrierten Verbindungen von Testosteron. Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei Zugabe von glucuronsäure- und wasserstoffübertragenden Cofermenten zu den Zytosolfraktionen nach 30 Minuten Inkubation.

Verglichen mit den Zytosolansätzen mit glucuronsäure- und wasserstoffübertragenden Cofermenten nach 30 Minuten Inkubation war bei den Zytosolansätzen nach 2 Stunden Inkubation ein höherer Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten, und zwar zu 5 β ,3 α -Androstadiolglucuronid (14 - 21 %) und zu 5 β ,3 β - bzw. 5 α ,3 α -Androstadiolglucuronid (0.4 - 6 %) festzustellen. Der Abbau von Testosteron zu freien und glucuronierten Metaboliten bei den Zytosolversuchen erfolgte also fast ausschliesslich zu 5 β -hydrierten Verbindungen, dabei bevorzugt zu 5 β ,3 α -Androstadiol und 5 β ,3 α -Androstadiolglucuronid. Der an menschlichen Leberschnitten nachgewiesene Stoffwechsel von Testosteron zu Δ^4 -Androstendion, 5 β - und 5 α -hydrierten sowie zu glucuronierten Metaboliten findet also in der Mikrosomen- und Zytosolfraktion der Leber statt. Die Glucuronierung von Testosteron lässt sich in beiden Fraktionen nachweisen. Während in der Mikrosomenfraktion nur 5 α ,3 α -Androstadiolglucuronid gebildet wurde, entstand in der Zytosolfraktion bei gleichen Inkubationsbedingungen fast ausschließlich 5 β ,3 α -Androstadiolglucuronid.

Die Inkubationsversuche von Gewebeschnitten und subzellulären Fraktionen humaner Leber mit Testosteron weisen darauf hin, daß die menschliche Leber 17 β -Hydroxy-C₁₉-Steroid-Oxydoreduktase-, 3-Oxo- Δ^4 -5 β -C₁₉-Steroid-Reduktase- und 3-Oxo- Δ^4 -5 α -C₁₉-Steroid-Reduktase- sowie Steroid-Glucuronyltransferase-Aktivität enthält. Während die 5 β -C₁₉-Steroid-Reduktase vorwiegend in der Zytosolfraktion lokalisiert ist, sind die 17 β -Hydroxy-C₁₉-Steroid-Oxydoreduktase- und die 5 α -C₁₉-Steroid-Reduktase-Aktivität in der Mikrosomenfraktion nachzuweisen. Die Steroid-Glucuronyltransferase-Aktivität ist in der Zytosol-, wie auch in der Mikrosomenfraktion nachzuweisen.

Neben den Inkubationsversuchen mit Schnitten und subzellulären Fraktionen aus menschlicher Leber wurden Untersuchungen mit perkutan gewonnenen Leberstanzzyclindern durchgeführt. Es sollte bei diesen Versuchen geklärt werden, ob auch in perkutan gewonnenen Stanzzyclindern eine Glucuronierung von Testosteron nachweisbar ist. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich der Stoffwechsel von Testosteron zu freien und glucuronierten Metaboliten in pathologisch verändertem Lebergewebe von dem in normalem Lebergewebe unterscheidet und ob der Stoffwechsel von Testosteron in Abhängigkeit vom Ausmaß der Leberzellschädigung unterschiedlich abläuft.

Inkubationsversuche von histologisch unauffälligen Leberstanzzyclindern mit ³H-Testosteron und Zugabe von glucuronierenden Cofermenten ergaben, daß nur ein geringer Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten nachweisbar ist. Inkubationen von Leberstanzzyclindern nur mit Zugabe von glucuronierenden Cofermenten sind also wegen des geringen Stoffwechsels nicht geeignet, Untersuchungen mit einer großen Zahl von Gewebeproben durchzuführen, um eventuell einen Unterschiedlichen Stoffwechsel zu erfassen. Die Inkubationsversuche mit Schnitten humaner Leber haben jedoch gezeigt, daß durch Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten der

Abbau von Testosteron, insbesondere zu glucuronierten Metaboliten, gesteigert werden kann. Es wurden deshalb bei allen weiteren Versuchen mit Leberstanzzy lindern neben glucuronierenden Cofermenten auch wasserstoffübertragende Cofermente zugesetzt, und zwar NAD, NADH, NADP, Glucose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase und es konnte dann auch mit Stanzzy lindern eine deutliche Glucuronierung von Testosteron nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Inkubationsversuche von histologisch normalen Leberstanzzy lindern mit ^3H -Testosteron und Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten entsprachen den Befunden, die bei den gleichen Inkubationsbedingungen mit Leberschnitten erhoben wurden. Auch bei der Inkubation von Stanzzy lindern war ein sehr hoher Abbau von ^3H -Testosteron zu glucuronierten Metaboliten festzustellen, und zwar vorwiegend zu den 5β -hydrierten Verbindungen $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol- und $5\beta,3\alpha$ -Androsteronglucuronid.

Frühere in vitro-Untersuchungen (ENGELHARDT et al., 1973) haben gezeigt, daß der Abbau von Testosteron zu freien Metaboliten in Abhängigkeit von der Leberhistologie nicht eindeutig anders abläuft als in normalem Lebergewebe.

Inkubationsversuche mit Leberstanzzy lindern unterschiedlicher Leberhistologie unter Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten ergaben, daß die Umwandlung von Testosteron zu freien Metaboliten in normalem Lebergewebe niedrig, in pathologisch verändertem Lebergewebe, so in Proben von Fettleber, chronischer Hepatitis und Zirrhose, höher lag (siehe die Abb. 13, 14 und 15). Auffälligere Unterschiede ergaben sich weiterhin im Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten. Normales Lebergewebe zeigte einen sehr hohen Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten (79 - 91 %), Fettleberproben (20 - 96 %) und Proben von chronischer Hepatitis (20 - 61 %) bildeten im Mittel weniger Glucuronidmetaboliten, wenn auch mit einer erheblichen Streubreite, und Proben von Leberzirrhose zeigten nur eine geringe

oder kaum eine Bildung von Glucuronidmetaboliten (0.8 - 16.4 %). Die Umwandlung von ^3H -Testosteron zu den vorwiegend glucuronierten Metaboliten $5\beta,3\alpha$ -Androsteronglucuronid, $5\beta,3\alpha$ -Androstandiol- und zu $5\alpha,3\alpha$ -Androstandiolglucuronid war, verglichen mit den Proben von normaler Histologie, bei den Proben von Fettleber mäßig und bei den Fällen von chronischer Hepatitis stark erniedrigt sowie bei den Fällen mit Zirrhosegewebe kaum nachweisbar. Diese Befunde erklären, warum normales Lebergewebe wenig freie und pathologisch verändertes Lebergewebe relativ viel freie Metaboliten aus Testosteron gebildet hat. Möglicherweise ist eine verringerte Glucuronsäuretransferaseaktivität in pathologisch veränderten Lebergewebsproben der limitierende Faktor für die Umwandlung von freien zu glucuronierten Metaboliten von Testosteron. Auffällig ist jedoch die große Streubreite der Ergebnisse bei den Inkubationsversuchen mit Lebergewebe von chronischer Hepatitis und Fettleber. Auch die Schwere der histologisch erkennbaren Lebererkrankung stand in keinem eindeutigen Zusammenhang zum Ausmaß der Glucuronierungskapazität der entsprechenden Probe. Auffällig war jedoch (siehe Abb. 15, S. 77), daß einige Proben mit chronischer Hepatitis eine ausgesprochen niedrige Glucuronierungsrate von Testosteron und dessen Metaboliten zeigten und wir setzten deshalb die Höhe der Umwandlung von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten in Beziehung zum Ausmaß der Entzündung, und zwar zur Höhe der Serum-Transaminasen SGOT und SGPT. Es fand sich eine hohe negative Korrelation zwischen den beiden Parametern Serum-Transaminasen und Glucuronierung, d.h. je ausgeprägter die Entzündung desto geringer war der Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten, und zwar unabhängig von dem zugrunde liegenden histologischen Befund des Leberstanzzyllinders (siehe Abbildung 16, S. 87). Nur die Proben mit Zirrhose zeigten unabhängig von der Höhe der Serumtransami-

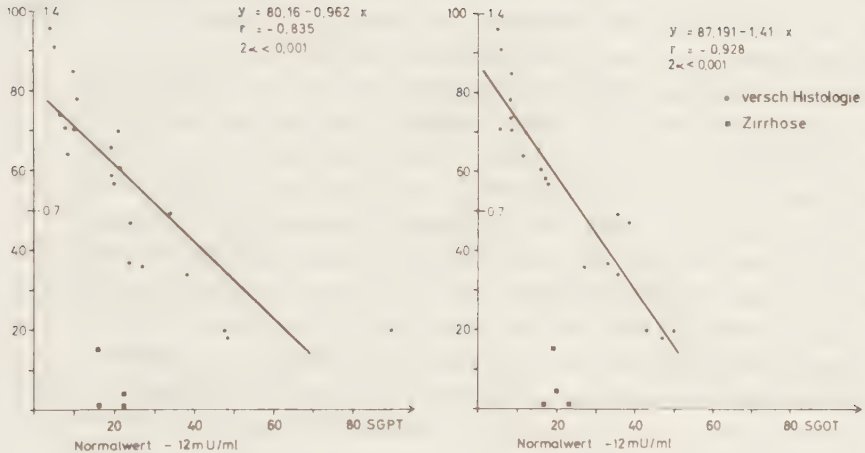


Abb.16: Beziehung zwischen der Höhe der Glucuronierung von Testosteronmetaboliten und der Höhe der Serumtransaminasen SGOT und SGPT nach Inkubation von Leberstanzzyllindern mit (1,2-³H)-Testosteron unter Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten (n = 25).

Siehe auch Legende zu Abb. 13, S. 75

nasen eine ausgesprochen geringe oder kaum eine Glucuronierung von Testosteron bzw. dessen Metaboliten. Diese Werte sind in den Abbildungen als Quadrate gekennzeichnet. Eine ähnlich hohe negative Korrelation fand sich auch zwischen der Höhe der Serum-Transaminasen und dem Ausmaß der Bildung von $5\beta,3\alpha$ -Androstandiolglucuronid, d.h. eine entzündlich oder zirrhotisch veränderte Leber vermag nur noch in verringertem Ausmaß 5β -Androstandiolglucuronid zu bilden (s. Abb. 17). Zwischen der Höhe des direkten Serum-Bilirubins, d.h. der Konzentration von Bilirubindiglucuronid und dem Ausmaß der Glucuronierung von Testosteronmetaboliten war bei den untersuchten Patienten keine Korrelation nachweisbar. Das würde bedeuten, daß die Glucuronierung von Testosteronmetaboliten und von Bilirubin durch verschiedene Glucuronyltransferasen erfolgt, und daß es bei einer Leberzellschädigung offenbar nur zu einer Aktivitätsminderung der Steroidglucuronyltransferasen, nicht jedoch zu einer Aktivitätsminderung der Bilirubinglucuronyltransferasen kommt, da gerade bei schweren Leberzellschädigungen die Konzentration von Bilirubinglucuronid im Serum nicht erniedrigt, sondern normal oder erhöht ist.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stimmen gut mit den in vivo-Befunden bei Leberkranken überein, die bei Patienten mit Fettleber, chronischer Hepatitis und Leberzirrhose häufig nicht nur eine verminderte Produktionsrate von Testosteron (KARL et al., 1971), sondern auch eine verminderte Ausscheidung von Testosteronglucuronid und der Testosteronmetaboliten 5α - und 5β -Androsteronglucuronid (RAITH et al., 1970) gefunden haben. Aus diesen Ergebnissen über den hepatischen Stoffwechsel von Testosteron kann man folgern, daß in der erkrankten Leber nicht der Stoffwechsel zu freien, jedoch zu glucuronierten Metaboliten gestört ist.

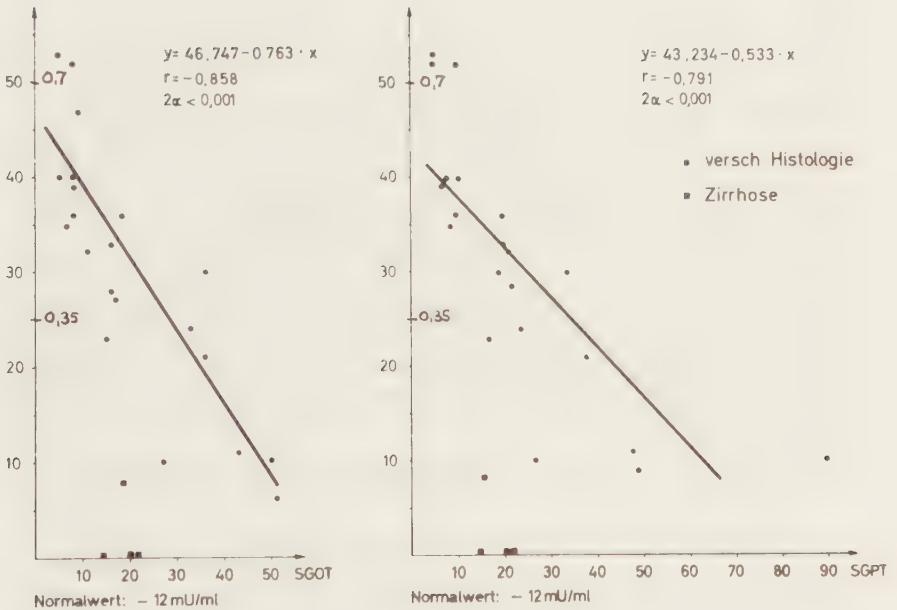


Abb.17: Beziehung zwischen der Höhe der Umwandlung von (1,2-³H)-Testosteron zu (1,2-³H)-5β,3α-Androstandiolglucuronid und der Höhe der Serumtransaminasen SGOT und SGPT nach Inkubation von Leberstanzzyklindern mit (1,2-³H)-Testosteron unter Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten (n = 25).

Siehe auch Legende zu Abb. 13, S. 75

VI. Zusammenfassung

Es wurde beim Menschen in vitro der Stoffwechsel von Testosteron zu freien und glucuronierten Metaboliten in Gewebeschnitten, subzellulären Fraktionen sowie in normalen und pathologisch veränderten Leberstanzzyllindern untersucht.

Gewebeschnitte, Stanzzyylinder und subzelluläre Fraktionen wurden mit (4-¹⁴C)-Testosteron und (1,2-³H)-Testosteron inkubiert. Die radioaktiv markierten Androgene und die entstandenen Metaboliten wurden aus dem Inkubationsmedium extrahiert, vorgereinigt und gaschromatographisch aufgetrennt.

Inkubationsversuche mit Leberschnitten ohne Zugabe von Cofermenten ergaben einen Stoffwechsel von Testosteron vorwiegend zu Δ^4 -Androstendion. Eine Umwandlung von Testosteron zu glucuronierten Steroidmetaboliten konnte nur in geringem Ausmaß festgestellt werden.

Bei Ansätzen mit Zugabe von glucuronierenden Cofermenten war der Abbau von Testosteron zu glucuronierten Testosteronmetaboliten etwas höher als bei den Ansätzen ohne Cofermente. Bei Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten zu dem Inkubationsmedium wurde Testosteron durch Leberschnitte verstärkt zu glucuronierten Steroidmetaboliten, und zwar zu 5 β ,3 α -Androstandiol-, 5 β ,3 α -Androsteron- und 5 α ,3 α -Androstandiolglucuronid abgebaut, wobei im Inkubationsmedium in der Fraktion der glucuronierten Steroide deutlich die 5 β -hydrierten Metaboliten überwogen.

Stoffwechselstudien an subzellulären Fraktionen der menschlichen Leber zeigten, daß Testosteron in der Mikrosomenfraktion bei Zugabe von glucuronierenden Cofermenten und bei Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten nach 30 Minuten Inkubation vorwiegend zu Δ^4 -Androstendion, 5 α ,3 α -Androstandiol und 5 α ,3 β -Androsteron und in sehr geringem Ausmaß zu glucuronierten Androgenen abgebaut wird.

Bei längerer Inkubation (2 h) kam es bei Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten zur Bildung von $5\alpha,3\beta$ -Androstadiol-, $5\alpha,3\alpha$ -Androsteron- sowie $5\alpha,3\alpha$ -Androstadiolglucuronid.

Im Gegensatz zur vorwiegenden hepatischen 5α -Hydrierung von Testosteron in menschlichen Mikrosomenfraktionen war bei Inkubationsversuchen von Zytosolfraktionen humaner Leber eine bevorzugte 5β -Hydrierung von Testosteron festzustellen. Bei Zugabe von glucuronierenden Cofermenten und bei Zugabe von glucuronsäure- und wasserstoffübertragenden Cofermenten nach 30 Minuten Inkubation zu Zytosolfraktionen aus humaner Leber waren vorwiegend die 5β -Verbindungen $5\beta,3\alpha$ -Androstadiol, $5\beta,3\alpha$ -Androsteron und 5β -Dihydrotestosteron gebildet worden. Bei beiden Inkubationsansätzen war kaum ein Abbau von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten nachweisbar.

Nach 2 Stunden Inkubationsdauer jedoch kam es bei Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragender Cofermenten zu Zytosolfraktionen zu einem verstärkten Abbau von Testosteron zu $5\beta,3\alpha$ -Androstadiolglucuronid.

Die Ergebnisse mit Gewebeschnitten und subzellulären Fraktionen der menschlichen Leber weisen darauf hin, daß in den Mikrosomen eine 17β -Hydroxy- C_{19} -Steroid-Oxydoreduktase- und eine $3\text{-Oxo-}\Delta^4\text{-}5\alpha\text{-}C_{19}$ -Steroid-Reduktase-Aktivität, im Zytosol eine $3\text{-Oxo-}\Delta^4\text{-}5\beta\text{-}C_{19}$ -Steroid-Reduktase-Aktivität vorhanden ist und daß in beiden subzellulären Fraktionen Steroidglucuronyltransferase-Aktivität nachweisbar ist.

In Leberstanzzyklindern mit normaler Histologie wurden bei Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten zum Inkubationsmedium ebenso wie bei Gewebeschnitten nur in geringem Ausmaß freie, vorwiegend jedoch glucuronierte, $5\beta,3\alpha$ -hydrierte Metaboliten aus Testosteron gebildet. In pathologisch verändertem Lebergewebe, so in Proben von Fettleber, chronischer Hepatitis und Leberzirrhose war der Stoff-

wechsel von Testosteron zu glucuronierten Metaboliten verringert, in Proben von Fettleber mäßig, bei chronischer Hepatitis stärker und bei Leberzirrhose sehr ausgeprägt. Bei allen untersuchten Lebergewebsproben- mit Ausnahme der Proben mit Zirrhose - bestand eine hohe negative Korrelation zwischen dem Ausmaß der Glucuronierung von Testosteronmetaboliten und der Höhe der Serumtransaminasen, und zwar unabhängig von den jeweiligen histologischen Veränderungen.

Proben von Leberzirrhose führten - unabhängig von der Höhe der Serumtransaminasen - nur zu einer geringen oder fast zu keiner nachweisbaren Glucuronierung von Testosteronmetaboliten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stimmen gut mit den in vivo-Befunden bei Leberkranken überein, die bei Patienten mit Leberzirrhose und mit Hepatitis eine deutlich erniedrigte Ausscheidung von glucuroniertem Testosteron und glucuronierten Testosteronmetaboliten im Urin ergeben haben.

VII. Anhang

Patient:	A.E.	A.E.	S.M.	S.M.	S.M.
<u>Extraktionsphasen</u>					
Ansatz	1	2	3	4	5
Inkubationsansatz vor der Extraktion	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
wässriger Durchlauf 1	9.1	3.8	17.9	12.5	14.2
wässriger Durchlauf 2	1.3	1.3	9.0	2.4	2.9
äthanolisches Eluat 1	90.9	96.2	82.1	87.5	85.8
äthanolisches Eluat 2	7.8	2.5	8.9	10.1	11.3

Tabelle I: Prozentuale Wiederfindung der ^3H - bzw. ^{14}C -Aktivität während der jeweiligen Aufarbeitungsschritte nach Inkubation von Leberschnitten mit (1,2- ^3H)-Testosteron (Pat. A.E.) bzw. (4- ^{14}C)-Testosteron (Pat. S.M.) ohne Zusatz von Cofermenten.

Patient:	S.M.	S.M.	S.M.	A.E.	A.E.
<u>Extraktionsphasen</u>					
Ansatz:	6	7	8	9	10
Inkubationsansatz vor der Extraktion	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
wässriger Durchlauf 1	29.8	17.0	9.9	19.9	24.9
wässriger Durchlauf 2	14.0	7.6	1.2	1.3	1.1
äthanolisches Eluat 1	70.2	83.0	90.1	80.1	75.1
äthanolisches Eluat 2	15.8	9.4	8.7	18.6	23.8

Tabelle II: Prozentuale Wiederfindung der ^{14}C - bzw. ^3H -Aktivität während der jeweiligen Aufarbeitungsschritte nach Inkubation von Leberschnitten mit (4- ^{14}C)-Testosteron (Pat. S.M.) ohne Zusatz von Cofermenten bzw. mit (1,2- ^3H)-Testosteron (Pat. A.E.) und Zusatz von glucuronsäureübertragenden Cofermenten.

Patient:	A.E.	A.E.	S.M.	S.M.	S.M.	S.M.
<u>Extraktionsphasen</u>						
Ansatz	11	12	13	14	15	16
Inkubationsansatz vor der Extraktion	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
wässriger Durchlauf 1	69.7	72.3	77.0	77.7	68.0	67.4
wässriger Durchlauf 2	0.8	4.8	1.4	3.1	3.0	6.4
äthanolisches Eluat 1	30.3	27.7	23.0	22.3	32.0	32.6
äthanolisches Eluat 2	68.9	67.5	75.6	74.6	65.0	61.0

Tabelle III: Prozentuale Wiederfindung der ^3H - bzw. ^{14}C -Aktivität während der jeweiligen Aufarbeitungsschritte nach Inkubation von Leberschnitten mit (1,2- ^3H)-Testosteron (Pat. A.E.) bzw. (4- ^{14}C)-Testosteron (Pat. S.M.) und Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten.

Patient:	A.E.	A.E.	A.E.	A.E.
<u>Extraktionsphasen</u>				
Ansatz	1	2	3	4
Inkubationsansatz vor der Extraktion	100.0	100.0	100.0	100.0
wässriger Durchlauf 1	1.1	4.4	4.1	10.4
wässriger Durchlauf 2	---	---	0.8	1.1
äthanolisches Eluat 1	98.9	95.6	95.9	89.6
äthanolisches Eluat 2	---	---	3.3	9.3

Tabelle IV: Prozentale Wiederfindung der ^3H -Aktivität während der jeweiligen Aufarbeitungsschritte nach Inkubation von Mikrosomenfraktionen der Lebergewebsprobe von Pat. A.E. mit (1,2- ^3H)-Testosteron unter Zusatz eines NADPH-regenerierenden Systems (Ansätze 1 und 2) bzw. unter Zusatz von glucuronsäureübertragenden Cofermenten (Ansätze 3 und 4).

Patient:	S.M.	S.M.	S.M.	S.M.	A.E.	A.E.
<u>Extraktionsphasen</u>						
Ansatz	5	6	7	8	9	10
Zeit(h)	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0	2.0
Inkubationsansatz vor der Extraktion	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
wässriger Durchlauf 1	1.3	1.3	2.0	1.0	22.8	50.8
wässriger Durchlauf 2	0.1	--	0.4	--	2.0	12.0
äthanolisches Eluat 1	98.7	98.7	98.0	99.0	77.2	49.2
äthanolisches Eluat 2	1.2	--	1.6	--	20.8	38.8

Tabelle V: Prozentuale Wiederfindung der ^{14}C - bzw. ^3H -Aktivität während der jeweiligen Aufarbeitungsschritte nach Inkubation von Mikrosomenfraktionen der Lebergewebsprobe von Pat. S.M. mit (4- ^{14}C)-Testosteron und der Lebergewebsprobe von Pat. A.E. mit (1,2- ^3H)-Testosteron unter Zusatz von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten.

Patient:	A.E.	A.E.	A.E.	A.E.
<u>Extraktionsphasen</u>				
Ansatz	1	2	3	4
Zeit(h)	2.0	2.0	2.0	2.0
Inkubationsansatz vor der Extraktion	100.0	100.0	100.0	100.0
wässriger Durchlauf 1	2.6	4.2	3.3	8.6
wässriger Durchlauf 2	--	--	--	0.2
äthanolisches Eluat 1	97.4	95.8	96.7	91.4
äthanolisches Eluat 2	--	--	--	8.4

Tabelle VI: Prozentuale Wiederfindung der ^3H -Aktivität während der jeweiligen Aufarbeitungsschritte nach Inkubation von (1,2- ^3H)-Testosteron mit Zytosolfractionen der Lebergewebsprobe des Pat. A.E. und Zugabe eines NADPH-regenerierenden Systems (Ansätze 1 und 2) bzw. von glucuronsäureübertragenden Cofermenten (Ansätze 3 und 4).

	Patient:	S.M.	S.M.	A.E.	A.E.
<u>Extraktionsphasen</u>					
Ansatz		5	6	7	8
Zeit(h)		0,5	0,5	2,0	2,0
Inkubationsansatz vor der Extraktion		100,0	100,0	100,0	100,0
wässriger Durchlauf 1		6,0	6,0	64,6	32,8
wässriger Durchlauf 2		2,3	1,5	3,2	3,0
äthanolisches Eluat 1		94,0	94,0	35,4	29,8
äthanolisches Eluat 2		3,7	4,5	61,4	67,2

Tabelle VII: Prozentuale Wiederfindung der ^{14}C - bzw. ^3H -Aktivität während der jeweiligen Aufarbeitungsschritte nach Inkubation von Zytosolfractionen der Lebergewebsprobe des Pat. S.M. mit (4- ^{14}C)-Testosteron und der Lebergewebsprobe des Pat. A.E. mit (1,2- ^3H)-Testosteron unter Zugabe von glucuronsäure- und wasserstoffübertragenden Cofermenten.

Patient:	L.P.	G.H.	G.L.	O.E.	H.L.
<u>Extraktionsphasen</u>					
Ansatz	1	2	3	4	5
Inkubationsansatz vor der Extraktion	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
wässriger Durchlauf 1	90.8	89.4	86.2	33.0	72.3
wässriger Durchlauf 2	3.0	6.2	6.0	---	3.0
äthanolisches Eluat 1	9.2	10.6	7.8	67.0	27.7
äthanolisches Eluat 2	87.8	83.2	80.2	---	69.3

Tabelle VIII: Prozentuale Wiederfindung der ^3H -Aktivität während der jeweiligen Aufarbeitungsschritte nach Inkubation von (1,2- ^3H)-Testosteron mit histologisch normalen Leberstanzzyllindern (Ansätze 1 - 3) und mit Stanzzyllindern von Patienten mit Fettleber (Ansätze 4 und 5) unter Zugabe von wasser- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten.

Patient:		F.J.	H.A.	S.H.	S.H.	E.A.
<u>Extraktionsphasen</u>						
Ansatz		6	7	8	9	10
Inkubationsansatz vor der Extraktion		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
wässriger Durchlauf 1		63.1	56.4	73.1	89.7	17.6
wässriger Durchlauf 2		1.0	4.2	8.1	3.7	2.0
äthanolisches Eluat 1		36.9	43.6	26.9	10.3	82.4
äthanolisches Eluat 2		62.1	52.2	65.0	86.0	15.6

Tabelle IX: Prozentuale Wiederfindung der ^3H -Aktivität während der jeweiligen Aufarbeitungsschritte nach Inkubation von (1,2- ^3H)-Testosteron mit Leberstanzzy lindern von Patienten mit Fettleber (Ansätze 6 - 10) unter Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Co-fermenten.

Patient:	F.W.	G.O.	S.J.	B.A.	H.H.
<u>Extraktionsphasen</u>					
Ansatz	11	12	13	14	15
Inkubationsansatz vor der Extraktion	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
wässriger Durchlauf 1	71.4	68.5	70.0	19.1	65.8
wässriger Durchlauf 2	12.0	1.3	10.4	0.8	8.9
äthanolisches Eluat 1	28.6	31.5	20.0	80.9	34.2
äthanolisches Eluat 2	59.4	67.2	69.6	18.3	56.9

Tabelle X: Prozentuale Wiederfindung der ^3H -Aktivität während der jeweiligen Aufarbeitungsschritte nach Inkubation von (1,2- 3)-Testosteron mit Leberstanzzy lindern von Patienten mit Fettleber (Ansätze 11 - 13) und von Patienten mit chronischer Hepatitis (Ansätze 14 und 15) unter Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten.

Patient:	K.R.	S.E.	S.R.	B.U.	D.W.
<u>Extraktionsphasen</u>					
Ansatz	16	17	18	19	20
Inkubationsansatz vor der Extraktion	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
wässriger Durchlauf 1	49.3	24.8	35.6	31.8	41.6
wässriger Durchlauf 2	8.0	5.3	6.2	0.6	2.2
äthanolisches Eluat 1	50.7	75.2	64.4	68.2	58.4
äthanolisches Eluat 2	41.3	19.5	29.4	31.2	39.4

Tabelle XI: Prozentuale Wiederfindung der ^3H -Aktivität während der jeweiligen Aufarbeitungsschritte nach Inkubation von (1,2- ^3H)-Testosteron mit Leberstanzzyklindern von Patienten mit chronischer Hepatitis (Ansätze 16 - 20) unter Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten.

Patient:	L.R.	P.J.	Z.I.	G.L.	G.T.
<u>Extraktionsphasen</u>					
Ansatz	21	22	23	24	25
Inkubationsansatz vor der Extraktion	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
wässriger Durchlauf 1	61.2	2.7	1.9	6.4	31.1
wässriger Durchlauf 2	2.6	1.4	1.1	3.4	3.8
äthanolisches Eluat 1	38.8	97.3	98.1	93.6	67.9
äthanolisches Eluat 2	58.6	1.3	0.8	3.0	28.3

Tabelle XII: Prozentuale Wiederfindung der ^3H -Aktivität während der jeweiligen Aufarbeitungsschritte nach Inkubation von (1,2- ^3H)-Testosteron mit Leberstanzzyklindern von Patienten mit chronischer Hepatitis (Ansatz 21) und von Patienten mit Leberzirrhose (Ansätze 22 - 25) unter Zugabe von wasserstoff- und glucuronsäureübertragenden Cofermenten.

	SGOT	SGPT	d.Bilirubin	17-Hydroxysteroid	17-Ketosteroid
<u>Patientinnen</u>					
A.E.	5.5	4.2	---	1.8	8.4
S.M.	---	---	---	1.7	9.2
G.L.	6.2	5.4	---	2.1	13.7
H.A.	18.4	19.7	0.21	---	---
S.H.	15.6	19.6	0.32	2.0	7.9
S.R.	32.7	23.7	0.23	2.1	5.0
B.U.	35.5	38.4	---	3.2	6.8
E.A.	50.0	90.0	---	1.2	4.2
D.W.	27.0	27.0	0.45	1.8	6.6
L.R.	16.2	21.6	---	---	---
F.I.	6.6	8.4	---	---	---
G.H.	8.4	9.7	---	2.3	11.0
Z.I.	16.8	16.8	0.19	2.8	9.2

Tabelle XIII: Übersicht über die Laborwerte der Patientinnen, bei denen Lebergewebe bzw. Leberstanzylinder gewonnen und untersucht wurden.

	SGOT	SGPT	d.Bilirubin	17-Hydroxysteroid	17-Ketoster
<u>Patienten</u>					
B.A.	46.8	48.6	0.39	2.8	10.5
.	38.6	24.2	---	1.7	5.0
F.W.	8.4	9.7	0.21	3.7	4.0
G.O.	5.4	8.2	---	1.3	5.1
S.J.	8.4	6.5	0.37	3.0	9.5
H.H.	17.2	19.4	---	---	---
K.R.	35.5	34.2	---	1.3	7.8
S.E.	43.0	48.0	0.32	2.8	10.7
H.L.	12.0	21.0	---	---	---
S.H.	5.3	4.5	0.17	---	---
P.J.	22.7	22.7	0.69	---	---
G.L.	20.4	22.3	---	---	---
L.P.	7.8	10.8	---	---	---
G.T.	18.8	15.4	---	2.5	12.2

Tabelle XIV: Übersicht über die Laborwerte der Patienten,
bei denen Leberstanzzyylinder gewonnen und
untersucht wurden.

Übersicht über die histologischen Leberveränderungen
bei 30 Patienten (Reihenfolge wie im Kapitel Ergebnisse).

Für die histologische Untersuchung der operativ und perkutan gewonnenen Lebergewebsproben sei Herrn Professor Dr.P.MEISTER (Pathologisches Institut der Universität München, Direktor: Professor Dr.M.EDER) herzlich gedankt.

A.E. K 3214/74

Makroskopisch: 1,5 x 1 cm große Leberkeilexzision von hellbrauner Farbe.

Mikroskopisch:

1. Lebergewebe mit erhaltener Organarchitektur, in den nicht vergrößerten Portalfeldern nur wenige Lymphozyten und Granulozyten, und z.T. Lymphozyten im Bereich von periduktalen Bindegewebsmanschetten als möglicher Hinweis auf eine abgelaufene Cholangitis. Die Hepatozyten zeigen keine wesentlichen Kerngrößenunterschiede, nur ganz vereinzelt Verfettung. Zentrolobulär wenig lipochromes Pigment. Die Eisenfärbung ist negativ. Keine Cholestase erkennbar. Im vorliegenden Material keine Befunde entsprechend einer aktiven Cholangitis.
2. Gallenblase mit intaktem, oberflächlich eingestülptem Epithel und mäßiger, vorwiegend lymphozytärer Durchsetzung, sowie stellenweise auch Fibroblastenwucherung und Fibrosierung. Die Befunde entsprechen einer mäßigen, chronisch-fibrierten Cholezystitis.

S.M. K 6027/74

- Makroskopisch:
1. Eine längs eröffnete 8 cm lange und bis 4 cm breite Gallenblase mit glatter grauer Serosa ödematös verdichteter Wand und unauffälliger grüner Schleimhaut.
 2. Ein unregelmäßiges grau-braunes, z.T. von Kapsel überzogenes Leberstückchen von maximal 1 x 1 x 0.2 cm Größe.

Mikroskopisch:

1. Z.T. abgeflachtes Relief der intakten oberflächlich eingestülpten Schleimhaut mit mäßiger vorwiegend lymphozytärer Durchsetzung und Fibrose, entsprechend einer mäßigen, chronischen Cholecystitis.
2. Lebergewebe mit erhaltener Organarchitektur. Z.T. vermehrt Lymphozyten und Granulozyten mit periductaler Fibrose. Die Hepatozyten zeigen geringe Kernpolymorphie und gelegentlich

Lochkerne. Keine Cholestase erkennbar.

Die Befunde entsprechen einer älteren und gering aktiven Cholangitis.

G.E. K 945/74

Makroskopisch: Ein ca. 2 cm langer dünner weißer Stanzzyylinder.

Mikroskopisch:

Mehrere kleine Lebergewebsfragmente, z.T. Portalbereiche mit geringer fibrotischer Vergrößerung erkennbar. Ein cirrhotischer Umbau lässt sich jedoch anhand der vorliegenden Präparate nicht nachweisen. Im portalen Bindegewebe eine dichtere vorwiegend lymphozytäre Durchsetzung, wobei einzelne Lymphozyten auch in das Parenchym eindringen. Typische Mottenfrassnekrosen jedoch nicht vorhanden. Einzelne Lymphozytenherde auch im Läppchen. Die Hepatozyten zeigen geringe bis mäßige Kernpolymorphie und gelegentlich Doppelkerne. Nur gelegentlich wenig lipochromes Pigment, feinkörnig. Geringe Wucherung der Kupferzellen. Die Befunde entsprechen einer mäßig aktiven vorwiegend mesenchymalen älteren Hepatitis.

Die Veränderungen können vereinbar sein mit einer chronisch persistierenden Hepatitis, wozu auch die Vorbefunde passen würden (vgl. K 7743/71 und K 3935/71) wobei damals jedoch z.T. etwas stärkere entzündliche Aktivität und z.T. auch stärkere Parenchymschädigung mit Einzelzellnekrosen vorhanden waren, die sich jetzt nicht mehr erkennen lassen.

E.P. K 1394/74

Makroskopisch: Graugelber, 2 cm langer Stanzzyylinder.

Mikroskopisch:

Noch erhaltene, z.T. jedoch gestörte Organarchitektur mit portaler Fibrose und netzartigen Kollagenisierung des angrenzenden Parenchym. Die Hepatozyten zeigen nur mäßige Kernpolymorphie, gelegentlich Doppelkerne, vereinzelt Lochkerne und in schätzungsweise 30 % klein- bis großtrophige Verfettung. In mehreren, besonders in den peripheren Hepatozyten körniges Eisen- positives Pigment, das auch in den gering gewucherten Kupferzellen vorliegt. Außerdem wenig lipochromes Pigment. Keine Cholestase erkennbar.

Die Befunde entsprechen einer meist retikulären Fibrose, unspezifischen Entzündung und mäßigen Verfettung, sie sind vereinbar mit einem toxisch-nutritiven Leberschaden, z.B. Alkoholabusus.

Ein sicherer zirrhotischer Umbau ist im vorliegenden Material nicht nachweisbar.

Z.H. K 2702/74

Makroskopisch: Ein insgesamt 2 cm langer, grau-brauner LSZ.

Mikroskopisch:

Mikroskopisch zeigen die Schnittstufen einzelne Glissonfelder, die nicht entzündlich infiltriert und nicht fibrosiert sind. Die Leberzellen zeigen ganz selten eine mittelgroßtropfige Einzelzellverfettung, außerdem finden sich vereinzelt kleine, umschriebene Lymphozyteninfiltrate intra-lobulär, in den Sinusoiden sind etwas vermehrt lymphoide Zellen nachweisbar. Die zentrolobulären und auch noch intermediären Leberzellen zeigen eine etwas verstärkte, lipochrome Pigmentierung, ganz selten zeigen Kupfferzellen eine feinstäubige Eisen-positive Pigmentreaktion. Granulome sind nirgends vorhanden.

Der Befund entspricht somit einer minimalen Einzelzellverfettung der Leber.
Für eine granulomatöse Hepatitis ergibt sich
im vorliegenden Gewebe kein Anhalt.

L.P. K 3348/75

Makroskopisch: 2,7 cm langer, weißlicher, braun gesprenkelter Leberstanzzyylinder.

Mikroskopisch findet sich im übersandten Material der Anschnitt einzelner kleiner Glisson'scher Felder. Diese zeigen stellenweise eine geringe Verbreiterung mit lockerer Ansammlung von Lymphozyten, eine Faservermehrung ist aber praktisch nicht erkennbar. Das Parenchym selbst zeigt fast keine entzündlichen Veränderungen, die Leberzellen sind nur ganz vereinzelt feintropfig, aber nirgends großtropfig verfettet. Eine Eisenfärbung fällt negativ aus, es ist etwas vermehrt Lipopigment erkennbar.

Somit ergibt sich, daß am vorliegenden Material kein Anhalt für eine Fettleber besteht, es ist nur eine sehr geringe Verfettung und eine mäßige herdförmige periportale Entzündungsreaktion entwickelt.

Diese periportale Entzündungsreaktion ist nicht sehr stark, in der vorliegenden Form ganz uncharakteristisch, nirgends

liegen Zeichen einer Aggressivität vor.

Ob es sich dabei um eine chronische periportale Entzündung, etwa als Begleitreaktion (reaktiv) handelt, oder um den Rest einer vorausgegangenen, eventuell chronischen Entzündung, läßt sich bei dem recht geringen Befund nicht abschätzen. Jedenfalls handelt es sich nicht um eine Fettleber.

G.H. K 2946/74

Makroskopisch: 2,8 cm langer, schwach brauner Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Gut erhaltene Organarchitektur, nur gelegentlich vereinzelt Entzündungszellen in den Portalfeldern sowie vereinzelt vermehrt Kollagenfasern im Bereich der Portalfelder. Die Hepatozyten zeigen keine wesentlichen Kerngrößenunterschiede. Nur selten z.T. im Bereich der Zentralvene kleine retikulohistiozytäre Knötchen (vereinbar mit Restknötchen). Außerdem zentrolobulär ganz vereinzelt kleintropfige Verfettung. Die Eisenfärbung ist negativ. Keine Cholestase erkennbar.

Die Befunde entsprechen einer minimalen und unspezifischen Entzündung und sind vereinbar mit einem Rest nach durchgemachter Hepatitis.

(Vgl. K 7060/73 mit nicht mehr frischer Virushepatitis).

G.L. K 728/74

Makroskopisch Ein ca. 1,5 cm langer hellbrauner Stanzzylinder

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur, in den nicht vergrößerten Portalfeldern nur wenige Lymphozyten. Die Hepatozyten zeigen nur geringe Kernpolymorphie und vereinzelt Doppelkerne. Im allgemeinen lockeres körniges blasses eosinrotes Zytoplasma. Ganz selten im Läppchenbereich z.T. kleine lympho-histiozytäre Herde. Ebenfalls zentrolobulär wenig lipochromes Pigment. Die Eisenfärbung ist negativ. Keine Cholestase erkennbar. Die geringe Leberzellunruhe und die z.T. granulomähnlichen Entzündungszellherde im Läppchen vereinbar mit Restknötchen sprechen dafür, daß es sich um einen Z.n. abgelaufener Hepatitis handeln könnte, mit posthepatitischer Hyperbilirubinämie.

O.E. K 721/74

Makroskopisch: Grau-gelber 1,5 cm langer Stanzzylinder.

Mikroskopisch:

Fragmentierte Leberstanze, Portalbereiche unauffällig oder mit geringer bis mäßiger lymphoplasmazellulärer Durchsetzung sowie einzelnen Kollagenlamellen, die als Läppchen einstrahlen. Die Hepatozyten zeigen geringe bis mäßige Kernpolymorphie, gelegentlich Doppelkerne und in schätzungsweise 50 % klein bis großtropfige Verfettung. Auch im Läppchen kleine Entzündungszellherde. In mehreren Hepatozyten staubkörnig bis feinkörnig eisenpositives Material gelegentlich auch lipochromes Pigment.

Geringe Wucherung der Kupfferzellen. Die Befunde entsprechen einer Fettleber mit mäßiger unspezifischer Entzündung und geringer retikulärer Fibrose.

Ein chirrhotischer Umbau ist nicht zu erkennen. Die Veränderungen vereinbar mit einem toxisch-nutritiven Leberschaden z.B. Alkoholabusus.

H.L. K 1313/75

Makroskopisch: Ein 3 cm langer, gelblich-brauner Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur, nur stellenweise eine geringe, meist zentrale perivenöse Fibrose. Kollagenisierung der z.T. ektatischen Sinuswände. Keine Zellvermehrung wie in den Portalbereichen. Die Hepatozyten zeigen geringe bis mäßige Kernpolymorphie, gelegentlich Doppelkerne und zentrolobulär lipochromes Pigment. In höchstens 10 % klein- bis mittelgroßtropfige Verfettung. Besonders zentrolobulär reichlich eisennegatives, z.T. feines, z.T. etwas grobkörniges Pigment. In den peripheren Hepatozyten und gelegentlich in den gering gewucherten Sinuszellen Eisenpigment. Keine sichere Cholestase erkennbar. Keine entzündlichen Veränderungen entsprechend einer Cholangitis.

Die Befunde entsprechen einer geringen Leberzellverfettung mit zentrolobulären Befunden, die auf eine mögliche, chronische venöse Abflußstörung der Leber hinweisen.

F.I. K 1312/75

Makroskopisch: Ein 2 cm langer, bräunlich gelber Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur, in den nicht vergrößerten Portalfeldern nur wenige Lymphozyten, Granulozyten. Die Hepatozyten zeigen geringe bis mäßige Kernpolymorphie, z.T. aufgelockertes Zytoplasma und regellos verteilt in ca. 10 % klein- bis großtropfige Verfettung. Ausserdem zentrolobuläre Sinusektasie, Kollagenisierung der Sinuswände und kleintropfige Verfettung, mit deutlich erkennbarem lipochromen Pigment. Die Befunde entsprechen einer geringen Leberzellverfettung, die zentrolobulären Veränderungen sprechen für eine geringe, chronische Stauung der Leber.

In den peripheren Hepatozyten stellenweise staubförmig Eisen. Eine granulomatöse Entzündung, wie z.B. M.Boeck im Material nicht zu erkennen.

H.A. K 4915/74

Makroskopisch: Ein 4 cm langer, weißlich brauner Leberstanz-
zylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur, die mitangeschnittenen Portalfelder z.T. mit gering vermehrten Lymphozyten und Granulozyten. Die Hepatozyten mit mäßiger Kernpolymorphie, gelegentlich Doppelkerne, im allgemeinen sehr lockeres, blasses Zytoplasma, (vereinbar mit erhöhtem Glykogengehalt) und gelegentlich mit Vakuolisierung, entsprechend einer geringen Leberzellverfettung und geringen unspezifischen entzündlichen Reaktion.

Eine mindestens 50%ige Verfettung wie bei der Fettleber liegt jedoch nicht vor.

Zentrolobulär nur wenig lipochromes Pigment.

Eisenfärbung negativ.

S.H. K 3917/74

Makroskopisch: 1,5 cm langer, teilweise hell-, teilweise
dunkelbrauner Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur. Portalfelder nicht vergrößert, von nur wenigen Lymphozyten und Granulozyten durchsetzt. Die Hepatozyten zeigen mäßige Kernpolymorphie und besonders

peripher mehrere Lochkerne. Regellos verteilt in höchstens 10 % klein- bis mittelgroßtropfige Verfettung. Geringe Wucherung der Kupfferzellen. Keine Cholestase erkennbar. Eisenfärbung negativ.

Die Befunde entsprechen einer

geringen Leberzellverfettung und einer sehr geringen unspezifischen Entzündung.

jedoch keine wesentlichen entzündlichen Veränderungen wie z.B. bei einer Hepatitis.

P.S.: Lochkerne, diabetische Stoffwechsellage?!

S.H. K 5374/74

Makroskopisch: Ein 1,4 cm langer, hellbrauner Leberzylinder.

Mikroskopisch sind in den Stufenschnitten einzelne schmale, gut abgrenzbare Glissonfelder angeschnitten, die gelegentlich eine geringe lymphozytäre Infiltration aufweisen. Die Leberzellen zeigen eine fein- bis großtropfige Verfettung in insgesamt ca. 35 %, teilweise mit Bevorzugung der perivenösen und intermediären Läppchenabschnitte.

Eine Eisenreaktion fällt negativ aus, eine Cholestase liegt nicht vor, auch findet sich keine verstärkte lipochrome Pigmentierung.

Der Befund entspricht somit einer

stärkeren Leberverfettung ohne Entzündung und ohne Fibrose.

E.A. K 4287/74

Makroskopisch: Ein 4 cm langer, hellbrauner Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur der Leber, die Portalfelder nicht vergrößert und von nur wenigen Lymphozyten und Granulozyten durchsetzt. Die Hepatozyten zeigen mäßige Kernpolymorphie, gelegentlich Doppelkerne und regellos verteilt in schätzungsweise 50 % klein- bis großtropfige Verfettung. Gelegentlich kleine Entzündungszellherde auch im Läppchen. In den gering gewucherten Kupfferzellen und vereinzelt auch in Hepatozyten eisenpositives Pigment. Z.T. Hämosiderin auch in kleinen Gruppen, wahrscheinlich im Bereich von früheren Nekrosen. Kein wesentlicher Unterschied zur vorausgegangenen Biopsie (vgl. 13930/73) mit Ausnahme einer vielleicht etwas geringeren Verfettung.

Die Befunde entsprechen einer Fettleber mit geringer Entzündung und einzelnen Nekrosen (I-II). Sie sind vereinbar mit einem toxisch-nutritiven Leberschaden, z.B. Alkoholabusus.

F.W. K 4288/74

Makroskopisch: Ein 1,5 cm langer, schwach-brauner Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur, die Portalfelder nicht vergrößert und nur von wenigen Lymphozyten und Granulozyten durchsetzt. Die Hepatozyten zeigen mäßige Kernpolymorphie, mehrere Lochkerne und in schätzungsweise 50 % klein- bis großtropfige Verfettung. Gelegentlich im Läppchen kleine Entzündungszellherde mit z.T. braun pigmentierten Makrophagen. Vorwiegend zentrolobulär reichlich braun-körniges lipochromes Pigment. In den gering gewucherten Kupfferzellen stellenweise Eisenpigment. Keine Cholestase erkennbar. Die Befunde entsprechen einer Fettleber mit geringer unspezifischer Entzündung (I-II). Sie sind vereinbar mit einem toxisch-nutritiven Leberschaden. Wegen der zahlreichen Lochkerne (Kernglykogenosen) kann an die Möglichkeit einer diabetischen Stoffwechsellage gedacht werden.

G.O. K 2910/74

Makroskopisch: 3 cm langer, weißlicher Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur, in den nicht vergrößerten Portalfeldern nur vereinzelt Lymphozyten und Granulozyten. Die Hepatozyten zeigen in schätzungsweise 50 % klein- bis großtropfige Verfettung. Besonders zentrolobulär z.T. frei in den Sinus braun pigmentierte Makrophagen. Gelegentlich auch neben lipochromem Pigment in den Hepatozyten grünbraunes Material, vereinbar mit Galle. Peripher außerdem staubförmig Eisen in den Leberzellen. Außerdem zentrolobulär eine geringe Fibrosierung, Hinweis auf eine mögliche durchgemachte, zentrolobuläre Nekrose. im übrigen besteht eine Fettleber, vereinbar mit einem toxisch-nutritiven Leberschaden, mit einer sehr geringen Cholestase (möglicherweise medikamentös, kein Hinweis auf eine Galleabflußstörung oder Cholangitis).

S.J. K 3751/74

Makroskopisch: 2,2 cm langer, schwach brauner Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur der Leber. Nur wenige Portalbereiche mitangeschnitten. Ein Portalbereich dicht von Lymphozyten, wenigen Eosinophilen und auch Granulozyten durchsetzt.

Die Entzündungszellen zeigen z.T. enge Beziehung zu einem mitangeschnittenen kleinen Gallengang. Die Hepatozyten mit geringer Kernpolymorphie, gelegentlich Doppelkernen und regellos verteilt in schätzungsweise 10 % klein- bis großtropfige Verfettung. Zentrolobulär Sinusektasie mit Kollagenisierung der Sinuswände. Wenig lipochromes Pigment. Keine Cholestase erkennbar.

Vereinzelte Eisenpigment in den gewucherten Kupfferzellen, jedoch keine stärkere Sternzellsiderose, wie bei einer Hämolyse.

Die Befunde entsprechen einer sehr geringen Leberzellverfettung, vereinbar mit einem toxisch-nutritiven Leberschaden.

Zentrolobuläre Sinusektasie mit vorwiegend kleintropfiger Verfettung und braunem Pigment. Hinweis auf eine mögliche venöse Abflußstörung.

Die portale Entzündung herdförmig und unspezifisch, wahrscheinlich reaktiv.

Keine atypischen, Hodgkin-verdächtigen Retikulo-histiozyten erkennbar.

B.A. K 730/74

Makroskopisch: Ein ca. 3 cm langer grau-weißer Stanzzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur, die Portalfelder nicht vergrößert, jedoch z.T. dichter vorwiegend lymphozytär durchsetzt. Kleine Lympho-histiozytäre Herde auch verstreut im Läppchen, bei nur geringer Zellunruhe der Hepatozyten. Geringe Kupfferzellwucherung, ganz vereinzelte kleintropfige Leberzellverfettung. Besonders in peripheren Hepatozyten wenig staubförmiges eisenpositives Material, das sich vereinzelt auch in den gering gewucherten Kupfferzellen findet. Die Befunde entsprechen einer sehr geringen Hepatitis, sie können vereinbar sein mit einer "subklinisch" verlaufenden, frischeren Hepatitis oder mit einer gering aktiven chronisch persistierenden Hepatitis. PS.: AAH?!

H.H. K 4046/74

Makroskopisch: Ein 1,5 cm langer, weißlicher Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur, z.T. jedoch fibrotisch vergrößerte Portalbereiche, die wiederum nur z.T. eine dichtere vorwiegend lymphozytäre Durchsetzung aufweisen, jedoch keine Aggressivität gegenüber dem Parenchym, also keine Mottenfrassnekrosen erkennbar. Die Hepatozyten zeigen nur geringe Kernpoly-

morphie, gelegentlich Doppelkerne und gleichmäßig blass eosinrot gekörntes Zytoplasma. Nur ganz vereinzelt kleine Lymphozytenherde im Parenchym. Im Zentralbereich gelegentlich hepatozytenfrei Abschnitte als Hinweis auf eine alte Entparenchymisierung erkennbar. Nur wenig lipochromes Pigment und gelegentlich kleine grün-braune Pigmentanteile in den Hepatozyten, die möglicherweise einer minimalen Cholestase entsprechen.

Die jetzt vorliegenden Veränderungen ähnlich der letzten Biopsie (K 2276/73) jedoch weniger stark ausgeprägt.

In der ersten Biopsie (vgl. K 3669/72) lag dagegen eine deutlich aktive Virushepatitis vor.

Entsprechend den Vorbefunden handelt es sich jetzt um eine vorwiegend portale und gering bis mäßig aktive Hepatitis vereinbar mit einer chronisch persistierenden Verlaufsform.

K.R. K 4220/74

Makroskopisch: Ein 2,8 cm langer, weißlich derber Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Leberstanze mit z.T. gestörter Organarchitektur, fibrotisch vergrößerten Portalbereichen, die in Bindegewebszüge übergehen. Dazwischen angedeutet knotige Parenchymanteile mit mäßiger Kernpolymorphie, mehreren Doppelkernen, z.T. aufgelockerten Zytoplasma sowie in schätzungsweise 30 % klein- bis großtropfige Verfettung. Im Bindegewebe mäßige unspezifische entzündliche Reaktion durch vorwiegend Lymphozyten und Granulozyten. Die Hepatozyten enthalten z.T. feinkörniges eisenpositives Material.

Die Befunde entsprechen einem, soweit erkennbar, beginnenden zirrhotischen Umbau mit mäßiger unspezifischer Entzündung und Verfettung; sie sind vereinbar mit einem toxisch-nutritiven Leberschaden, z.B. Alkoholabusus.

S.E. K 4283/74

Makroskopisch: Ein 3,5 cm langer, gelber Leberstanzzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur der Leber, Portalfelder z.T. gering fibrotisch vergrößert mit einzelnen Kollagenlammellen, die ins Läppchen einstrahlen. Nur wenige Entzündungszellen im portalen Bindegewebe. Die Hepatozyten zeigen geringe bis mäßige Kernpolymorphie, gelegentlich Doppelkerne und regellos verteilt in schätzungsweise 25 % klein- bis großtropfige Verfettung.

Besonders in den peripheren Hepatozyten reichlich meist körniges eisenpositives Pigment, das sich auch in den gering gewucherten Kupfferzellen findet.

Die Befunde entsprechen einer mäßigen Leberzellverfettung mit mäßiger portaler Entzündung und Fibrose.

Die Veränderungen sind vereinbar mit einem toxisch-nutritiven Leberschaden, z.B. Alkoholabusus.

Eine mindestens 50%ige Leberzellverfettung wie bei einer Fett-leber liegt nicht vor.

S.R.

K 4045/74

Makroskopisch: Ein 2,7 cm langer, gelber Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur, die nicht vergrößerten Portalfelder von wenigen Entzündungszellen vorwiegend Lymphozyten durchsetzt. Die Hepatozyten zeigen nur geringe Kernpolymorphie, gelegentlich Lochkerne und stellenweise aufgelockertes Zytoplasma. Zentrolobulär feinkörnig braunes lipochromes Pigment. Eisenpositives Material, nur vereinzelt staubförmig in Hepatozyten.

Die Befunde entsprechen einer geringen und unspezifischen entzündlichen Reaktion.

Keine Lymphominfiltration (s.Brill-Symmers) erkennbar.

B.U.

K 2947/74

Makroskopisch: 2,3 cm langer, hellbrauner Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur, in den nicht vergrößerten Portalfeldern nur wenige Lymphozyten und Granulozyten. Einzelne kleine Entzündungszellherde aus Granulozyten und Sinuszellen auch im Läppchen. Die Hepatozyten zeigen nur geringe Kernpolymorphie, gelegentlich Doppelkerne und regellos verteilt in schätzungsweise 10 % klein- bis großtropfige Verfettung. Nur wenig lipochromes Pigment in den zentralen Hepatozyten. Staubbörmiges Eisenpigment peripher in geringen Mengen.

Die Befunde entsprechen einer geringen Leberzellverfettung und unspezifischen entzündlichen Reaktion. Stellenweise finden sich kleine retikulohistiozytäre Knötchen, doch eindeutige epitheloidzellige Granulome wie bei M.Boeck sind nicht zu erkennen.

Nur vereinzelt Kollagenfasern im Zusammenhang mit den Zentralvenen, jedoch keine stärkeren Hinweise auf eine mögliche venöse Abflußstörung der Leber.

D.W. K 4063/74

Makroskopisch: Ein 2,5 cm langer, gelber Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur, die Portalfelder z.T. jedoch gering fibrotisch vergrößert mit einzelnen Kollagenlamellen, die ins Läppchen einstrahlen. In dem portalen Bindegewebe wenige Lymphozyten und Granulozyten. Die Hepatozyten zeigen mäßige Kernpolymorphie, mehrere Doppelkerne und in schätzungsweise 30 % klein- bis großtropfige Verfettung. Bei allgemeiner Wucherung der Kupfferzellen gelegentlich kleine retikulohistiozytäre Knötchen. Stellenweise auch Lochkerne erkennbar. In den gewucherten Kupfferzellen und z.T. auch in dem portalen Bindegewebe Eisenpigment. Zentrolobulär lipochromes Pigment. Keine Cholestase erkennbar. Auch keine entzündlichen Veränderungen der Gallengänge entsprechend einer Cholangitis im vorliegenden Material auffindbar. Die Befunde entsprechen einer Fettleber mit geringer Entzündung und Fibrose (II-III). Sie sind vereinbar mit einem toxisch-nutritiven Leberschaden.

L.R. K 1308/75

Makroskopisch: Ein 2 cm langer, hell-brauner Leberzylinder.

Mikroskopisch:

Erhaltene Organarchitektur, die Portalfelder nicht vergrößert und z.T. dichter, vorwiegend lymphozytär durchsetzt. Einzelne eosinophile und neutrophile Granulozyten. Lymphozytenherde auch verstreut im Läppchen mit geringer allgemeiner Wucherung der Kupfferzellen. Die Hepatozyten zeigen nur geringe Kerngrößenunterschiede. Nur wenig lipochromes Pigment. Keine sichere Cholestase und nur staubförmig Spuren von Eisen nachweisbar. Die Befunde entsprechen einer älteren, vorwiegend "mesenchymalen" Hepatitis, die gut mit einer chronisch persistierenden Form vereinbar sein kann. Für eine Cholangitis keine weiteren Veränderungen erkennbar, insbesondere keine Entzündungen der Gallengänge (vgl. auch 4225/74 mit ähnlichen entzündlichen Veränderungen in der Biopsie vor ca. 1 Jahr; auch dieser Bereich würde eine chronisch persistierende Form der Hepatitis weiter untermauern.

P.J. K 3361/74

Makroskopisch: Ein 1,6 cm langer, weißlicher, derber LS2.

Mikroskopisch:

Zerstörte Organarchitektur mit Narbenfelder und Bindegewebssepten, die von mäßig vielen Entzündungszellen durchsetzt werden und unregelmäßige Parenchyminseln einschließen. Das Parenchym unscharf vom Bindegewebe abgegrenzt. Die Hepatozyten mit mäßiger Kernpolymorphie, aufgelockertem Zytoplasma und gelegentlich kleinen hyalinen Körnern. Außerdem in ca. 40 % klein- bis großtropfige Verfettung, feinkörnig lipochromes Pigment. Die Eisenfärbung ist negativ. Auch im Parenchym netzförmige Fibrose erkennbar.

Die Befunde entsprechen einer

Leberzirrhose mit mittelgradiger Verfettung und unspezifischer Entzündung.

Sie sind vereinbar mit einem toxisch-nutritiven Leberschaden, z.B. Alkoholabusus.

Z.I. K 2536/74

Makroskopisch: Mehrere Fragmente eines insgesamt 2 cm langen, bräunlich gesprenkelten Leberstanzylinders.

Mikroskopisch:

Bindegewebszüge, gelegentlich mit noch erkennbaren, eingeschlossenen portalen Anteilen und gestörter Organarchitektur, wobei größere Parenchymbereiche mit "exzentrischen" Ästen der Vena hepatica auffallen. Nur geringe unspezifische entzündliche Aktivität, vorwiegend durch Lymphozyten. Die Hepatozyten zeigen mäßige Kernpolymorphie, mehrere Doppelkerne und zahlreiche Lochkerne (!). In den Hepatozyten bevorzugt, jedoch nicht ausschließlich zentrolobulär feinkörnig braunes, eisen negatives Pigment (Hinweis auf einen möglichen Arzneimittelabusus oder auf Pigmentablagerungen im Rahmen einer Stoffwechselkrankheit). In höchstens 10 % klein- bis mittelgroß-tropfige Verfettung.

Es besteht eine Fibrose, wahrscheinlich mit zirrhotischem Umbau.

Klinisch sollte eine Stoffwechselkrankheit, insbesondere ein Morbus Wilson weiter abgeklärt werden. Spezialfärbungen für Kupfer sind am Formol-fixierten Material leider nicht mehr gut durchführbar.

G.L. K 14640/74

Makroskopisch: Ein 2,3 cm langer, gelblicher LSZ.

Mikroskopisch:

Mikroskopisch finden sich in dem Leberstanzzyylinder mehrere Glissonfelder mit teilweise geringgradiger Verbreiterung oder Ausziehung und nur leichter Kollagenfaservermehrung. Gleichzeitig liegt eine geringe Lymphozyteninfiltration vor. Die Leberläppchen sind normal gebaut, die Leberzellen zeigen jedoch eine stärkergradige Verfettung. Insgesamt sind etwa die Hälfte der Leberzellen hiervon betroffen. Ganz vereinzelt finden sich Leberzelluntergänge. Zeroidmakrophagen sind nicht nachweisbar, auch zeigt sich keine Siderinspeicherung. Eine Cholestase besteht ebenfalls nicht.

Der Befund entspricht einer stärkergradigen Leberparenchymverfettung mit geringer entzündlicher Reaktion und geringer Fibrose des portalen Mesenchyms (Fettleber Grad II nach Kalk) und wahrscheinlichem zirrhotischen Umbau.

G.T. K 5373/74

Makroskopisch: Ein 1,5 cm langer, weißlich bröckeliger Leberzylinder.

Mikroskopisch zeigen die Stufenschnitte eine gestörte Organarchitektur, wobei verschieden breite, lockere Fibrosefelder mit chronisch-entzündlicher Infiltration vorliegen, die das Parenchym teilweise unterteilen. Die Leberzellen zeigen unregelmäßig verteilt eine mittelgroßtropfige Verfettung in insgesamt ca. 20 %, fast durchwegs findet sich eine zarte, perisinusoidale Sklerose.

Eine Eisenreaktion fällt negativ aus, eine Cholestase ist nicht vorhanden.

Nur vereinzelt sind zugrundegehende Leberzellen zu erkennen.

Der Befund entspricht somit einer ausgeprägten retikulären Fibrose, einer mäßigen chronischen, uncharakteristischen Entzündung und einer mäßigen Verfettung der Leber.

Dabei besteht ein zumindest partieller zirrhotischer Parenchymumbau.

Der Befund wäre gut vereinbar mit einer ursprünglichen Fettleber, die jetzt in einen zirrhotischen Parenchymumbau übergegangen ist.

VIII. Literaturnachweis

- BAULIEU, E.-E. and P. MAUVAIS-JARVIS: Studies on testosterone metabolism. II. Metabolism of testosterone-4-¹⁴C and androst-4-en-3,17-dione-1,2-³H.
J.Biol.Chem. 239, 1578 (1964)
- BAULIEU, E.-E., ROBEL, P. and R. EMILIOZZI: Studies on testosterone metabolism. III. The selective "5 β -metabolism" of testosterone-glucuronide.
J.Biol.Chem. 240, December issue (1965)
- BAULIEU, E.-E., ROBEL, P., EMILIOZZI, R. and A. ALBERGA:
In Vermeulen, A. and D. - Exley: Androgens in normal and pathological conditions.
Excerpta Med. Foundation, Amsterdam 211 (1966)
- BAULIEU, E.-E.: A 1966 critical survey of steroid hormone metabolism. In: Proceedings, II. Intern. Congress on Hormonal Steroids.
Excerpta Med. Foundation (1967)
- BAULIEU, E.-E.: On the metabolism of testosterone and its compartmentalization. In: Tamm J., Ed., Testosterone, Proceedings of the workshop conference,
Georg Thieme, Stuttgart (1968)
- BAULIEU, E.-E.: The action of hormone metabolites: a new concept in endocrinology.
Europ. J. clin. Biol. Res. 15, 723 (1970)
- BERCOVICI, J.-P. and P. MAUVAIS-JARVIS: Testosterone metabolism in hepatic cirrhosis and after acute estrogen treatment.
Rev. Europ. Etudes Clin. and Biol. 16, 805 (1971)

- BREUER, H., BREUER, J. and B.P. LISBOA: Intermediary metabolism of testosterone in human liver under normal and pathological conditions.
In: "Testosterone": Hsg. J. Tamm, Thieme Verlag(1968)
- CHAMBAZ, E.-M., G. MAUME, B. MAUME and E.-C. HORNING: Silylation of steroids. Formation of enol trimethylsilyl ethers and oxysilylation products.
Anal. Letters 1, (12), 749 (1968)
- DEMISCH, K., BIRCKELBACH, P., AMMEDICK, U. and W. STAIB: Subcellular distribution of testosterone metabolites after perfusion of isolated livers of guinea pig.
Acta Endocrin. 62, 147 (1969)
- DOHAN, F.C., RICHARDSON, E.M., BLUEMLE, L.W. and P. GYÖRGY: Hormone excretion in liver disease.
J. clin. Investigation 31, 481 (1952)
- ENGELHARDT, D. und P. UNTERBURGER: Untersuchungen über den Stoffwechsel von Testosteron durch Lebergewebe von Menschen.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 77 Bd., J.F. Bergmann, München, 1215 (1971)
- ENGELHARDT, D., UNTERBURGER, P. and H.J. KARL: Studies of C₁₉-steroid-enzyme activities in normal and pathological human liver tissue.
18. Symp. Dtsch. Ges. Endokrin., Acta endocr. (KbH), Suppl. 159, 18 (1972)
- ENGELHARDT, D. and H.J. KARL: Testosterone metabolism in slices and subcellular fractions of human liver.
Acta endocr. (KbH), Suppl. 173, 132 (1973)
- ENGELHARDT, D.: Hepatischer und extrahepatischer Stoffwechsel von Testosteron beim Menschen.
Habilitationsschrift (1973)

- FISHMAN, W.-H. and H.-G. SIE: Formation of testosterone glucuronide surviving liver slices.
J. Biol.Chem. 218, 335 (1956)
- GUSTAFSSON, J.A. and B.P. LISBOA: Biosynthesis of 6 β -hydroxy-testosterone from testosterone by human fetal liver microsomes.
Steroids 11, 555 (1968)
- HORNING, E.C. and K.B. EIK-NES: Gas phase chromatography of steroids.
Springer-Verlag, Berlin (1968)
- ISSELBACHER, K.J.: Enzymatic mechanism of hormone metabolism.
II. Mechanism of hormonal glucuronide formation.
Rec. Progr. Hormone Research 12, 134 (1956)
- KARL, H.J., WIEDEMANN, M. und L. RATH: Produktion und Stoffwechsel von Corticosteroiden und Androgenen bei der Leberzirrhose.
Klin.Wschr. 49, 340 (1971)
- KREBS, H.A. und K. HENSELEIT: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33 (1932)
- LISBOA, B.P., DROSSE, I. and H. BREUER: Stoffwechsel von Testosteron in Leberschnitten des Menschen.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 342, 123 (1965)
- LISBOA, B.P., GUSTAFSSON, J.A. and J. SJÖVALL: Studies on the metabolism of C₁₉-steroids in rat liver microsomes.
Europ. J. Biochem. 4, 496 (1968)
- LISBOA, B.P. and J.A. GUSTAFSSON: Studies on the metabolism of steroid in the fetus. Biosynthesis of 16 α -hydroxy-testosterone in the human fetal liver.
Endokrinologie 56, 262 (1970)

- PETERSON, R.E.: Adrenocortical steroid metabolism and adrenal cortical function in liver disease.
J.clin.Investigation 39, 320 (1960)
- PIERCE, A.E.: Silylation of organic compounds.
Pierce Chemicals Co, Rockford/Illinois (1968)
- RAITH, L., WIEDEMANN, M. und H.J. KARL: Beziehungen zwischen Produktion, Metabolismus und Ausscheidung von Corticosteroiden und Androgenen bei der Leberzirrhose.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 76. Bd., J.F. Bergmann, München 893 (1970)
- RAO, G.-S., RAO, M.-L. et H. BREUER: Studies on a Testosterone Glucuronyltransferase from the Cytosol fraction of human liver.
Biochem. Journal 119, 635 (1970)
- SAMUELS, L.T., SWEAT, M.L., LEVEDAHL, B.H., POTTNER, M. and M.L. HELMREICH: Metabolism of testosterone by liver of different species of animals.
J. Biol. Chem. 183, 231 (1950)
- SCHRIEFERS, H., KECK, B. und M. OTTO: Biosynthese von Steroid-glucuroniden bei verschiedenen Stoffwechselzuständen.
Acta Endocr. 50, 25 (1965)
- SCHRIEFERS, H., GHRAF, R. und F. POHL: Zur Frage des Verhaltens der UDP-Glucuronyl-Transferase-Aktivität unter Nahrungsentzug und im Alloxandibetes.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 344, 25 (1966)
- SCHRIEFERS, H., CREMER, W. und M. OTTO: Sex differences in testosterone metabolism of the perfused rat liver.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 183 (1967)

- SCHRIEFERS, H. und B. KÖRFER: Metabolit - Muster in der Glucuronidfraktion nach Perfusion der Leber männlicher Ratten mit Testosteron.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1393 (1968)
- SCHRIEFERS, H.: Regulation des Steroidhormonstoffwechsels in der Leber. In: Leber, Endokrinium und Wasserhaushalt S. 34 - 46.
Wannagat Hrsg., Stuttgart: Thieme-Verlag (1969)
- SCHRIEFERS, H., GHRAF, R. und M. BRODESSER: Geschlechtsspezifika der Biosynthese von Steroidglucuroniden in der mit Testosteron perfundierten Rattenleber.
Acta Endokr. 63, 59 (1970)
- SCHRIEFERS, H., KLEY, H.-K., REHNITZ, D. und E. LAX:
Alterationen im Testosteronstoffwechsel als Folge einer fehlgeleiteten sexuellen Entwicklung der Ausstattung der Rattenleber mit Enzymen des Steroidstoffwechsels.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 31 (1971 a)
- SCHRIEFERS, H., GHRAF, R., HOFF, H.-G. und H. OCKENFELS:
Einfluß von Alter und Geschlecht auf die Entwicklung und Differenzierung der Aktivitätsmuster von Enzymen des Steroidhormonstoffwechsels in der Leber von Ratten zweier verschiedener Tierstämme.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1363 (1971 b)
- SCHRIEFERS, H., GHRAF, R. und E., R. LAX: Sex-specific aglucone patterns of testosterone metabolism in rat liver and their alteration following interference with the sexual differentiation.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 371 (1972)

- STAIB, W., DEMISCH, K. et P. BIRCKELBACH: Influence of albumin on testosterone metabolism in isolated perfused livers of guinea pigs.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 181 (1971)
- STAIB, W., HETZEL, W., D. and R. KIEHNSCHERF: Excretion of isotopically labeled metabolites of testosterone in the bile of male rats.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1143 (1974)
- STYLIANOU, M.E., E. FORCHIELLI, M. TUMMILLO and R.I. DORFMAN: Metabolism in vitro of 4-¹⁴C-testosterone by a human liver homogenate.
J. Biol. Chem. 236, 692 (1961)
- UNTERBURGER, P.: Über den Abbau und die Konversion von Testosteron in vitro durch Lebergewebe des Menschen.
Dissertation (1973)
- VERMEULEN, A.: Secretion rates of androgens in human subjects, Int. Congr. Series Nr. 184, p. 863
Amsterdam: Excerpta Medica Foundation (1969)
- WIEDEMANN, M., RAITH, L. und H.J. KARL: Untersuchungen über die Adsorption von Steroiden an Florisil und Amberlite. Methode der getrennten Bestimmung der Glucuronide und Sulfate von Androgenen.
Z. Anal. Chem. 252, 287 (1970)
- WORTMANN, W., KNAPSTEIN, P., MAPPES, G. und G.W. OERTEL: In vivo-Perfusion der menschlichen Leber mit 7 α -³H-Testosteron.
16. Symp. Dtsch. Ges. Endokrin., Abstract Nr.20 (1970)

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr.D.ENGELHARDT in der Zeit von November 1973 bis Juni 1975 an der I. Medizinischen Klinik der Universität München durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr.H.SCHWIEGK, daß ich in seiner Klinik arbeiten durfte.

Weiter gilt mein Dank Herrn Professor Dr.H.J.KARL für die grosszügige Förderung meiner Arbeit.

Besonders herzlich danke ich Herrn Privatdozent Dr.D.ENGELHARDT für seine wertvolle Hilfe und freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Dr.P.UNTERBURGER möchte ich vor allem für die bereitwillige Hilfe und seine wertvollen Rat-schläge danken.

Lebenslauf

Am 11. April 1950 wurde ich als Sohn des Landwirts Konrad Hahn und seiner Ehefrau Katharina, geb. Maier in Neuaich, Lkrs. Eggenfelden, geboren.

Von 1956 bis 1961 besuchte ich die Volksschule in Huldessen und trat anschließend in das Kurfürst-Maximilian-Gymnasium in Burghausen ein, wo ich 1970 die Reifeprüfung ablegte.

Anschließend begann ich im Wintersemester 1970/71 das Medizinstudium an der Universität München.

Das Vorphysikum legte ich im September 1971 ab, das Physikum bestand ich im April 1973. Famuliert habe ich in der I. Medizinischen Universitätsklinik in München. Vor dem Wintersemester 1975/76 melde ich mich zum Staatsexamen.

Seit August 1973 bin ich verheiratet und bewohne mit meiner Frau Franziska, geb. Berger, eine Zweizimmerwohnung in München.

